

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## FIÈVRE RÉCURRENTÉ A *SPIROCHÆTA HISPANICUM* EN ALGÉRIE

### TRANSMISSION PAR LE RHIPICÉPHALE DU CHIEN PRÉMUNITION SÉRUM DE CONVALESCENTS

par ANDRÉ SERGENT [*in memoriam*] (1).

(*Institut Pasteur d'Algérie.*)

*En publiant ce travail, fruit d'un labeur de plusieurs années brusquement interrompu par le plus injuste des destins, le Comité de Direction des Annales tient à exprimer les regrets que lui cause la disparition d'André Sargent, au seuil même d'une carrière scientifique qui s'annonçait pleine de promesses. L'Institut Pasteur tout entier partage la douleur de notre cher collègue, le docteur Edmond Sargent, Directeur de l'Institut Pasteur d'Alger et de Mesdames Sargent ; il s'associe au deuil qui les frappe si cruellement et leur adresse le témoignage de sa profonde sympathie.*

#### I

### PREMIERS CAS OBSERVÉS EN ALGÉRIE

En 1923, Sadi de Buen a constaté l'existence en Espagne, dans la province de Cacérès, d'une fièvre récurrente particu-

(1) Ces recherches ont été faites avec la collaboration dévouée de M<sup>lle</sup> H. Richard, laborantine.

lière, due à un spirochète qu'il appela *Treponema (Spirochaeta) hispanicum*, et caractérisée par le haut pouvoir pathogène du spirochète pour le cobaye, le nombre et la faible durée des accès de rechute, l'inefficacité d'un traitement arsenical.

En 1928, Charles Nicolle et Anderson montrèrent l'existence de la fièvre récurrente espagnole au Maroc où la maladie est retrouvée ensuite par plusieurs observateurs.

En 1931, Charles Nicolle, Anderson et Le Chuiton signalèrent la fièvre récurrente hispano-nord-africaine en Tunisie.

En mai 1933, nous avons rapporté, avec A. Manceaux et R. Balliste, le premier cas algérien de fièvre récurrente hispano-nord-africaine. Trois autres observations algériennes ont suivi.

PREMIER CAS (2). — En 1933, un pêcheur d'un village maritime, à 48 kilomètres à l'ouest d'Alger, fait quatre accès fébriles assez violents, au cours desquels des spirochètes sont trouvés dans le sang. Du sang prélevé après la fin du troisième accès infecte des cobayes et des souris, et ce virus est conservé depuis cinq ans, sans modification, par passages sur cobayes.

DEUXIÈME CAS (3). — Observé par R. Horrenberger, en août 1933, à l'Institut Pasteur d'Algérie. Le malade, qui habite la banlieue d'Alger, fait trois accès de fièvre récurrente, au cours desquels l'examen microscopique du sang montre la présence de spirochètes qui sont infectants pour des cobayes et pour des souris. La formule leucocytaire du sang du malade indique une polynucléose (90 p. 100 de polynucléaires, 2 p. 100 de lymphocytes, le restant de 8 p. 100 étant constitué par des mononucléaires moyens et grands). Des injections de novarsénobenzol n'ont produit aucun effet manifeste sur l'évolution de la maladie.

TROISIÈME CAS (4). — Dans la banlieue d'Alger, chez un homme de quarante-cinq ans, trois violents accès fébriles, au cours desquels apparaissent dans le sang des spirochètes qui se montrent pathogènes pour le cobaye et pour la souris.

QUATRIÈME CAS (5). — En août 1936, des spirochètes sont trouvés dans des gouttes épaisses du sang d'un homme de dix-sept ans, présen-

(2) André SERGENT, A. MANCEAUX et R. BALLISTE. Premier cas de fièvre récurrente hispano-africaine observé en Algérie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 26, 12 juillet 1933, p. 906-908.

(3) R. HORRENBARGER. Deuxième cas de fièvre récurrente hispano-africaine observé en Algérie. *Bull. Soc. Path. exot.*, 26, 11 octobre 1933, p. 994-995.

(4) André SERGENT et H. LÉVY. Spirochétose hispano-africaine chez un homme piqué par une tique du chien (*Rhipicephalus sanguineus*). *Bull. Soc. Path. exot.*, 28, 13 novembre 1935, p. 789-790.

(5) Observation inédite de A. SERGENT et G. BICHELBERGER (de Cap Matifou).



tant un accès fébrile (40°1), ayant débuté par un grand frisson et des vomissements alimentaires, dans un village situé à 30 kilomètres à l'est d'Alger. Du sang est prélevé à la fin de l'accès (38°3, un spirochète sur 10 champs). 2 cobayes, inoculés sous la peau avec 3 cent. cubes de ce sang, ainsi que des souris, sont infectés. Ce virus est transmissible régulièrement de cobaye à cobaye.

\*  
\* \*

Le diagnostic des quatre premiers cas algériens de fièvre récurrente hispano-nord-africaine, observés tous les quatre dans un rayon de 50 kilomètres autour d'Alger, n'a pu être posé que par les recherches de laboratoire : examen microscopique du sang et inoculation du sang au cobaye et à la souris. Sur les 4 malades, le premier a eu quatre accès, 2 en ont eu trois, 1 a eu un seul accès. Essayé chez les 3 premiers malades, un traitement arsenical s'est montré sans efficacité.

## II

### MODE DE TRANSMISSION ET RÉSERVOIR DE VIRUS

Sur les quatre cas algériens de fièvre récurrente hispano-nord-africaine, deux (deuxième et quatrième observations) n'ont pas pu, en raison des circonstances, faire l'objet de recherches sur le mode de contamination.

Dans les deux cas où l'agent vecteur a pu être recherché, on a été amené à mettre en cause la tique méridionale du chien, *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. Dans notre troisième observation, un homme est atteint de spirochétose à *Sp. hispanicum* après avoir été piqué par un *Rhipicephalus sanguineus*, dans un milieu d'où les ornithodores sont sûrement absents. Dans la première observation, deux *Rhipicephalus sanguineus*, prélevés sur le chien du malade atteint de récurrente, inoculés à 2 cobayes, les ont infectés de spirochétose. Dans la même localité existaient des ornithodores, *Ornithodoros erraticus* (= *O. maroccanus*) dont ni la piqûre ni l'inoculation n'infectent des cobayes.

D'autre part, des essais de transmission expérimentale de la fièvre récurrente hispano-nord-africaine au laboratoire, de cobaye à cobaye, par la piqûre de *Rhipicephalus sanguineus*, ont donné des résultats positifs.

A. — Faits d'observation relatifs à la transmission  
dans la nature.

*Premier fait positif.* — Lorsque nous avons observé, en 1933, le premier cas algérien de fièvre récurrente hispano-nord-africaine (6) nous avons cherché, dans l'entourage du malade, l'agent transmetteur de cette spirochétose. Le malade, un pêcheur, habite Chiffalo, un hameau côtier des environs d'Alger. Nous remarquons que son chien, qui partage sa vie sur terre et sur mer, est infesté de *Rhipicephalus sanguineus*, la tique méridionale du chien. Or, cet Ixodiné pique plusieurs espèces animales, ainsi que l'homme. Nous nous sommes donc demandé si, dans une telle localité contaminée, des rhipicéphales ne peuvent pas s'infecter sur des porteurs de germes et transmettre par piqure, à un stade suivant, l'infection à des sujets neufs. Les épreuves expérimentales ont donné à cette double question une réponse affirmative.

Nous prélevons sur le chien du malade deux rhipicéphales, une femelle et un mâle. Chaque tique est lavée à l'eau salée stérile, broyée et inoculée sous la peau d'un cobaye. Le cobaye inoculé avec la tique femelle présente un accès thermique et parasitaire après quatre jours d'incubation, et le cobaye inoculé avec la tique mâle après six jours. Des expériences de prémunition croisée ont montré que les spirochètes isolés des tiques de Chiffalo appartiennent à la même espèce que les *Sp. hispanicum* isolés du malade de Chiffalo, ainsi que ceux d'une autre souche humaine algérienne.

D'autre part, ce hameau de Chiffalo est infesté de rats d'égout, chez lesquels, comme nous le dirons plus loin, nous constatons l'existence de *Sp. hispanicum*. Dans la poussière des terriers de ces rats d'égout nous trouvons de très nombreux ornithodores qui sont connus, depuis Sadi de Buen, comme vecteurs du virus de la récurrente hispano-nord-africaine. 40 ornithodores à différents stades, mis à piquer sur un cobaye, ne l'infectent point. 40 autres ornithodores nym-

(6) André SERGENT, A. MANCEAUX et R. BALLISTE, *loc. cit.*



phes et adultes, broyés et inoculés à 2 cobayes, ne les infectent pas non plus.

En résumé, dans une localité où existe la spirochétose hispano-nord-africaine humaine et murine, des rhipicéphales sont trouvés porteurs de spirochètes. Des ornithodores sont capturés dans la même localité, mais la présence du virus de cette spirochétose n'est pas décelée dans les lots d'ornithodores inoculés à des cobayes.

*Deuxième fait positif.* — Le troisième cas algérien de spirochétose hispano-nord-africaine est observé, dans la banlieue d'Alger, dans un milieu favorable à la recherche étiologique. Le malade habite une dépendance de l'Institut Pasteur (annexe rurale de Kouba). Les Arthropodes piqueurs qui peuvent infester le domaine sont depuis longtemps l'objet d'études ; on n'y a jamais trouvé d'ornithodores ; les rhipicéphales sont nombreux sur les chiens de garde. On n'y a jamais fait d'expériences sur les spirochètes.

Le 17 juillet 1933, un employé de l'Institut Pasteur est occupé pendant plusieurs heures dans la matinée à enlever les tiques (*Rhipicephalus sanguineus*) qui couvrent un chien de garde. Il sent une piqûre à l'avant-bras droit et se gratte à travers son sarrau. Le soir, en quittant son vêtement, il découvre une tique fixée à l'avant-bras, à l'endroit de la piqûre du matin : un *Rhipicephalus sanguineus* ♂. De plus, en arrachant les tiques du chien, il s'était souillé les doigts, à plusieurs reprises, avec le contenu intestinal des rhipicéphales.

Dix-huit jours plus tard (7), début d'un accès fébrile d'une durée de dix jours, suivi de deux rechutes au cours desquelles des spirochètes apparaissent dans le sang du malade. Ces spirochètes, inoculés à des cobayes, leur donnent une infection normale, ils appartiennent donc à l'espèce *Spirochæta hispanicum*.

Les circonstances n'ont pas permis de rechercher l'infection spirochétienne chez les tiques de la localité.

(7) On sait que l'incubation de la spirochétose humaine est, en général, de deux à quatorze jours, mais on a signalé des « incubations retardées » (MUEHLENS).

## B. — Transmission expérimentale.

Nous avons voulu voir si, dans des expériences de laboratoire, des rhipicéphales infectés de *Sp. hispanicum* peuvent transmettre, à un stade ultérieur, l'infection par piqûre. L'expérience suivante montre qu'il en est ainsi :

Des larves de *Rhipicephalus sanguineus*, mises sur des cobayes porteurs de spirochètes (souche humaine algérienne de Chiffalo), se gorgent en quatre jours. Elles se détachent et muent après neuf jours. Deux jours plus tard, ces tiques sont placées à l'état de nymphes sur 4 cobayes, dont 2 jeunes. Après dix-sept jours d'incubation, l'un des jeunes cobayes présente un accès thermique et parasitaire intense.

\*  
\* \*

En résumé : 1° on trouve des « tiques méridionales du chien », *Rhipicephalus sanguineus*, naturellement infectées de spirochètes dans une localité où 1 cas humain et des cas murins sont constatés ; 2° on observe 1 cas de spirochétose hispano-nord-africaine chez un homme qui a été piqué par une « tique du chien » et qui vit dans un milieu où les ornithodores sont inconnus et où on n'a jamais fait d'expérience sur les spirochétozes ; 3° des rhipicéphales, nourris au stade larvaire sur des rongeurs infectés de spirochètes, sont capables, au stade suivant, de transmettre le virus par piqûre à un sujet neuf (7 bis).

Il résulte de ces faits observés en Algérie que, dans des conditions naturelles, la fièvre récurrente hispano-nord-africaine peut être transmise par piqûre, non seulement par des Argasins du genre *Ornithodorus*, comme on le savait, mais aussi par l'Ixodiné *Rhipicephalus sanguineus* (8).

(7 bis) A. SERGENT. Un nouvel agent de transmission naturelle de la récurrente hispano-africaine : la tique du chien (*Rhipicephalus sanguineus*). C. R. de l'Acad. des Sc., 197, 2 octobre 1933, p. 177.

(8) Dans des expériences de laboratoire, M. BALTAZARD n'a pas pu faire transmettre des souches marocaines de *Spirochaeta hispanicum* par des rhipicéphales. Même insuccès de J. CAMINOPETROS expérimentant avec la variété *peloponesicum* et *Rh. sanguineus*. Au contraire, E. BRUMPT



## C. — Réservoir de virus.

LE RAT. — En raison de l'importance reconnue des rongeurs comme réservoir de virus de la spirochétose hispano-nord-africaine, nous avons recherché, en mai 1933, l'existence de *Sp. hispanicum* chez les rats d'égout du petit village maritime de Chiffalo où nous avons observé le premier cas algérien. Neuf lots de 10 rats sont capturés, sacrifiés, et les cerveaux inoculés à des cobayes. Un de ces lots infecte les cobayes. Les rats d'égout constituent donc dans ce petit port un réservoir de virus.

En 1936, à Aïn Taya (quatrième cas algérien), un seul rat a pu être capturé. Son cerveau n'a pas été infectant pour le cobaye.

En 1933-34, R. Horrenberger (9) inocule, à l'Institut Pasteur d'Algérie, dans le péritoine de 23 cobayes, le cerveau broyé de 230 rats d'égout de la ville d'Alger partagés par lots de 10. Sur ces 23 lots, 3 ont conféré aux cobayes inoculés l'infection spirochétienne caractéristique à *Sp. hispanicum*. Donc, sur 230 rats, 3 au moins étaient porteurs de germes.

L'existence de spirochétoses enzootiques chez les rats d'Algérie avait été démontrée en 1918, à l'Institut Pasteur d'Algérie, par A. Lhéritier (10). Plus de 200 cobayes inoculés dans le péritoine avec des broyats d'organes viscéraux d'autant de rats d'égout d'Alger s'infectent de spirochétose dans une proportion qui varie de 0,5 à 6 p. 100 suivant la saison et le quartier d'origine.

réussit cette transmission. Sur 11 cobayes piqués par des rhipicéphales infectés de *Sp. hispanicum* à l'état larvaire, ou inoculés avec des broyats de ces acariens, 2 seulement présentent une infection : 1 cobaye piqué par plus de 800 nymphes et 1 cobaye inoculé sous la peau avec une partie du broyat de 110 nymphes gorgées.

Les cas positifs sont peut-être exceptionnels, mais ils existent dans la nature et ils peuvent être reproduits au laboratoire.

(9) R. HORRENBARGER. Les rats d'Alger réservoir de virus de la fièvre récurrente hispano-africaine. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, **14**, décembre 1936, p. 418-420.

(10) A. LHÉRITIER. Premières recherches sur les spirochétoses des rats d'Alger. *Bull. Soc. Path. exot.*, **11**, 9 mai 1918, p. 357-359.

La proportion des rats d'égout infectés de spirochétose enzootique à Alger et dans les environs est donc la suivante :

A Chiffalo (1933) . . . . .	1 sur 90
A Alger (1917-1918) . . . . .	3 sur 109
	3 sur 50
A Alger (1933-1934) . . . . .	1 sur 50
	3 sur 230

LE CHIEN. — Le fait que deux rhipicéphales prélevés sur le chien d'un malade se sont montrés infectés de *Sp. hispanicum* fait rechercher si ce chien est également infecté : on examine son sang pendant vingt-huit jours sans trouver de spirochètes dans les gouttes épaisses. On le sacrifie, son cerveau est inoculé, à la dose de 1 cent. cube, à 2 cobayes : ils ne s'infectent pas.

Nous rappelons à ce sujet que dans le sang provenant d'un chien de la même région, R. Bosselut (11) a observé, en 1924, à l'Institut Pasteur d'Algérie, un spirochète qu'il a nommé *Sp. caninum* : une chienne briarde de dix mois présente, au printemps, de l'anémie, de l'abattement et de l'inappétence, avec une température normale. On trouve sur des frottis de sang des spirochètes non rares (1 pour 1.200 globules rouges environ), de 8 à 22  $\mu$  de longueur et de 0  $\mu$  3 de largeur, à tours de spire le plus souvent irréguliers, au nombre de 3 à 6. Le pas de la spire mesure en moyenne 1  $\mu$  8.

A ce propos E. Brumpt est d'avis qu'on peut « admettre le rôle du chien comme réservoir de virus de la fièvre récurrente hispano-nord-africaine. »

L'HOMME. — L'hypothèse d'un réservoir de virus humain d'une spirochétose nord-africaine ne peut pas être exclue. A. Catanei procédant, à l'Institut Pasteur d'Algérie, à l'établissement de l'indice plasmodique, au cours d'une enquête sur le paludisme à Boufarik, à 25 kilomètres d'Alger, trouve des spirochètes dans le sang de 4 enfants sur 5 d'une famille indigène. Ces enfants présentent tous l'apparence d'une parfaite santé. Au cours de visites ultérieures, Catanei retrouve

(11) R. BOSSELUT. Sur un spirochète sanguicole du chien domestique. *Bull. Soc. Path. exot.*, 18, 11 novembre 1925, p. 702-704.



des spirochètes dans le sang périphérique de 2 des enfants, respectivement quatre-vingt-dix-huit jours et cinquante-quatre jours après le premier examen positif. A aucun moment, il ne constate de symptômes morbides méritant de retenir l'attention. Cette infection sanguine à spirochètes, de longue durée, sans symptômes apparents, chez des enfants indigènes algériens, fait supposer que l'homme peut en être un réservoir de virus (12).

Des faits de même ordre ont encore été observés depuis lors par l'Institut Pasteur d'Algérie : au cours d'enquêtes sur l'épidémiologie du paludisme dans l'Aurès, Clastrier (13) a trouvé des porteurs de spirochètes présentant l'apparence d'une bonne santé chez 4 indigènes : 2 hommes (de vingt-cinq et de vingt-sept ans), 1 jeune garçon de huit ans, 1 fille de quatorze ans. Les spirochètes existent donc à l'état d'infection latente chez des indigènes de diverses régions de l'Algérie.

### III

#### I. MORPHOMÉTRIE. — II. VITALITÉ. — III. VIRULENCE

##### I. — Morphométrie.

Les mensurations faites sur plusieurs centaines de *Sp. hispanicum* dans des gouttes épaisses ou sur des frottis de sang prélevé à des jours différents, au cours des accès de première invasion ou de rechute, chez divers sujets, donnent les chiffres présentés dans le tableau suivant, en face des chiffres concernant *Sp. berberum*, agent de la spirochètose à poux en Afrique du Nord (14).

(12) A. CATANEL. Infection sanguine à spirochètes, de longue durée, sans symptômes apparents, chez des enfants indigènes algériens. *Bull. Soc. Path. exot.*, **16**, 13 juin 1923, p. 392-394.

(13) *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, **14**, décembre 1936, p. 512-513.

(14) Edm. SERGENT et H. FOLEY. Recherches sur la fièvre récurrente et son mode de transmission, dans une épidémie algérienne. *Ann. Institut Pasteur*, **24**, mai 1910, p. 337-375.

*Id.* *Recherches expérimentales sur la pathologie algérienne*, Imp. Torrent, Alger, 1910, p. 279-347.

La coloration du spirochète non altéré est uniforme.

		<i>Spirochæta</i> <i>hispanicum</i> d'Algérie	<i>Spirochæta</i> <i>berberum</i>
Longueur.	{ Moyenne. . . . .	De 11 à 12 $\mu$ .	De 15 $\mu$ à 18 $\mu$ .
	{ Maximum (sans trace de di- vision). . . . .	21 $\mu$ .	24 $\mu$ .
	{ Minimum . . . . .	5 $\mu$ .	12 $\mu$ .
Epaisseur moyenne du spirochète . . .		Moins de 0 $\mu$ 25.	De 0 $\mu$ 25 à 0 $\mu$ 30.
Nombre moyen de tours de spire. . . .		De 4 à 5.	De 4,5 à 8.
Maximum . . . . .		8	9
Minimum. . . . .		2	3
Pas de spire . . . . .		3 $\mu$ .	De 2 $\mu$ 5 à 3 $\mu$ .
Largeur du tour de spire. . . . .		1 $\mu$ 5.	De 1 $\mu$ à 1 $\mu$ 4.

On trouve des formes de division transversale, sous l'aspect de 2 spirochètes réunis par une de leurs extrémités effilées, qui sont à peine colorées. La longueur des 2 spirochètes résultant de la division est parfois égale, parfois inégale. Il n'y a pas de chaînes de plus de 2 spirochètes.

On ne voit pas de formes de division longitudinale. Parfois, 2 spirochètes accolés peuvent donner l'illusion d'une division longitudinale.

A la fin des accès apparaissent des formes d'involution en spirale, en peloton, entortillées, enchevêtrées.

## II. — Vitalité.

*Résistance du Sp. hispanicum dans le milieu extérieur à différentes températures, pendant des temps variables.* — On a mesuré la durée de la survie du virus :

1° à la température du laboratoire (14°-20°) ;

2° à la température de 0° ;

3° à la température de -10°.

Le virus utilisé est du sang de cobaye fortement parasité (10 à 12 spirochètes par champ microscopique de goutte épaisse). Ce sang, citraté et conservé dans les conditions indi-



quées, est inoculé, après un délai fixé, à des cobayes, sous la peau.

Pour chaque essai, on expérimentait sur 2 cobayes. La température des cobayes était prise 2 fois par jour, le sang était examiné tous les jours en goutte épaisse, pendant trente jours. Pour s'assurer que les cobayes, dont l'examen de sang n'avait pas montré de spirochètes pendant trente jours, n'avaient pas une infection latente, ils étaient inoculés le trentième jour avec du sang virulent de la même souche.

Sur 29 échantillons de sang citraté conservés à 14-20° depuis deux jours jusqu'à trente-trois jours, 25 ont été virulents. Les 6 échantillons, conservés à cette température, de trente-trois à soixante jours, n'ont pas été virulents.

Sur 20 échantillons de sang citraté conservés à 0° depuis deux jours jusqu'à sept semaines, 18 ont été virulents. 1 échantillon conservé huit semaines n'a pas été virulent.

Du sang citraté conservé un jour à —10° a encore été virulent pour 2 cobayes, mais 11 échantillons conservés à —10° de deux jours à vingt-et-un jours n'ont plus été infectants.

En résumé, les expériences faites sur 80 cobayes ont abouti aux conclusions suivantes :

La température la plus favorable à la conservation du virus *in vitro* est celle de 0°. Il survit à 0° pendant six ou sept semaines.

A 14-20°, il résiste presque aussi longtemps (quatre à cinq semaines).

A —10°, au contraire, il meurt assez vite, il est encore vivant après un jour, mais ne l'est plus dès le deuxième jour.

### III. — Caractères pathogènes.

#### A. — INOCULATION DU VIRUS SOUS LA PEAU.

La dose inoculée est de 1 cent. cube de sang parasité. La température des animaux est prise pendant au moins un mois. L'examen microscopique journalier du sang à l'objectif à immersion porte sur au moins 100 champs de goutte épaisse et l'on compte le nombre de parasites trouvés par champ

microscopique. Si l'examen microscopique ne donne que des résultats négatifs, le sang (et, dans quelques cas, le cerveau) est inoculé sous la peau à des animaux sensibles. Ceux-ci sont suivis pendant un mois au moins.

Les espèces animales qui se sont montrées réfractaires à la souche algérienne sont : le porc (1 cas), l'âne (2 cas), le chat (3 cas).

Les autres animaux expérimentés se sont montrés sensibles d'une façon inégale.

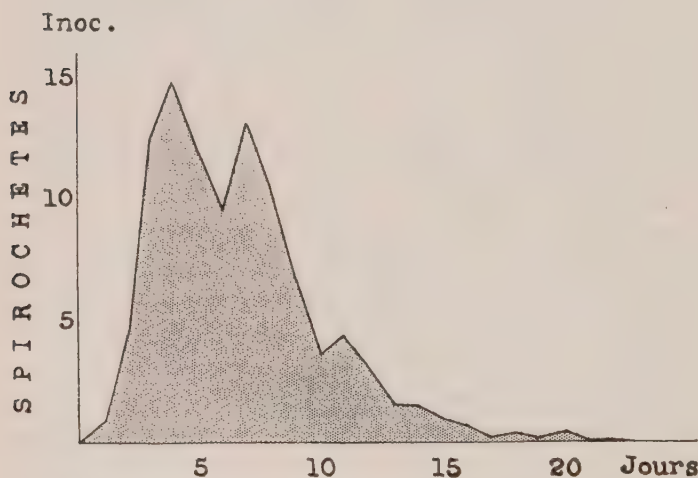


FIG. 1. — Accès parasitaire à *Spirochæta hispanicum* chez le cobaye (moyenne de 110 observations). Remarquer les 2 clochers de la courbe.

**COBAYE.** — Plus de 2.100 cobayes ont été inoculés avec des souches algériennes de *Sp. hispanicum* isolées de cas humains ou de tiques *Rhipicephalus sanguineus*. Ils se sont régulièrement infectés, comme ils le sont par les souches marocaines et tunisiennes.

Les cobayes inoculés présentent un accès aigu de première invasion, à la fois fébrile et parasitaire. A cet accès succède un stade métacritique d'infection latente.

La durée et la gravité de l'infection expérimentale du cobaye n'ont pas changé au cours des passages en série au laboratoire pendant quatre ans. La gravité de l'infection n'est aucunement en rapport avec le nombre de spirochètes inoculés.



L'accès fébrile a une incubation d'environ cinq jours et une durée moyenne d'environ trois jours. La température maxima observée est de 41°8.

L'accès parasitaire a une incubation de trois jours environ, une durée moyenne de treize ou quatorze jours (minimum, huit jours ; maximum, vingt-deux jours). Le nombre de spirochètes comptés en goutte épaisse dépasse souvent 70 par champ. Au delà de ce chiffre, les spirochètes sont incomptables.

L'accès parasitaire devient très vite violent : dès le deuxième ou le troisième jour. Il est intense du deuxième au douzième

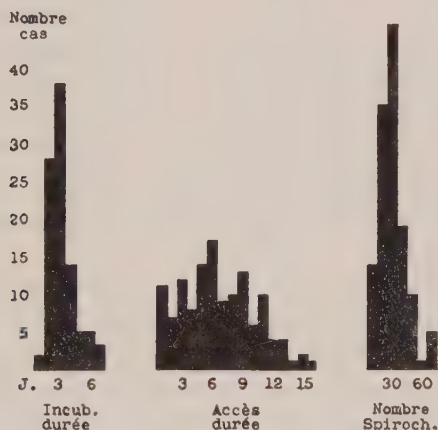


FIG. 2. — Accès parasitaire chez le cobaye (moyenne de 110 observations. I, durée de l'incubation; II, durée de l'accès; III, nombre maximum de parasites par champ microscopique de goutte épaisse examinée à l'objectif à immersion.

jour compris. La courbe que l'on peut tracer avec les chiffres journaliers des parasites dessine deux clochers, le premier les troisième et quatrième jours, le second le septième jour. Un caractère particulier de l'infection à *Sp. hispanicum* du cobaye est cette rémission marquée au milieu de l'accès aigu parasitaire qui, de ce fait, apparaît souvent comme formé de deux accès subintrants. Ce caractère de la spirochètose expérimentale du cobaye rappelle la récurrence typique de l'infection humaine.

Après l'accès aigu, l'infection spirochétienne devient latente et le reste pendant de longs mois. Cette phase latente chro-

nique métacritique confère la prémunition, comme nous le verrons plus loin.

Le *S. hispanicum* algérien, d'origine humaine de Chiffalo, a passé dans le lait des 4 femelles de cobayes chez qui il a été recherché (15).

LAPIN. — Le lapin est sensible à la souche algérienne. Sur 18 lapins inoculés sous la peau avec du sang de cobayes infectés, 17 ont donné des résultats positifs. L'incubation est très courte, comme chez le cobaye (moyenne, deux jours ; minimum, un jour ; maximum, trois jours). Pas d'accès fébrile. L'accès parasitaire est plus court et moins intense que celui du cobaye : les spirochètes sont présents dans le sang périphérique pendant quatre jours en moyenne (minimum, un jour ; maximum, huit jours). Le nombre maximum de parasites dans le sang ne dépasse guère, en général, l'unité par champ de goutte épaisse (minimum 1 pour 40 champs de goutte épaisse examinés à l'objectif à immersion ; maximum, 8 par champ).

Les réactions sérologiques de Bordet-Wassermann, de Meinicke et de Vernes au péréthynol ont été recherchées avec le sérum de lapin infecté de *Sp. hispanicum* et, en même temps, avec le sérum de lapins neufs témoins. Les résultats ont été tout à fait discordants. Des résultats positifs et d'autres négatifs ont été constatés aussi bien parmi les lapins à spirochètes que parmi les lapins neufs.

SOURIS BLANCHE. — La souris blanche est sensible à la souche algérienne. Incubation, vingt-quatre heures. Accès parasitaire régulier de courte durée. Survie.

SINGE. — Le singe, inoculé sous la peau avec du sang de cobaye, s'infecte régulièrement (3 cas). Incubation de vingt-quatre ou quarante-huit heures, accès fébrile et accès parasitaire de première invasion de quatre ou cinq jours. Dans 1 cas sur 3, une rechute est apparue après dix jours et a duré cinq jours. Survie.

(15) A. SERGENT. Passage dans le lait du spirochète de la fièvre récurrente hispano-africaine (souche algérienne). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 26 mars 1936, p. 236.



CHIEN. — Les chiens inoculés sous la peau se montrent sensibles à la souche algérienne dans la proportion de 5 sur 6. Il y a lieu de rapprocher ce fait de l'infection naturelle par *Sp. hispanicum* de tiques du chien (*Rhipicephalus sanguineus*) que nous avons constatée en Algérie.

Chez 2 jeunes chiens inoculés sous la peau, les spirochètes apparaissent dans le sang après une incubation de quarante-huit heures et sont présents, chez le premier, 2 fois à six jours d'intervalle, chez l'autre, sept jours consécutifs.

Sur 4 chiens adultes inoculés, 3 n'ont jamais présenté de spirochètes à l'examen microscopique du sang, mais leur sang prélevé à la saphène infecte des cobayes à la dose de quelques gouttes. Le sang de 2 de ces chiens, prélevé quinze jours après l'inoculation, infecte les cobayes après une incubation de dix à douze jours. L'histoire du troisième chien adulte est intéressante ; il est saigné tous les huit jours : cinq jours (2 cobayes), douze jours (2 cobayes), dix-neuf jours (2 cobayes) et vingt-six jours (2 cobayes) après l'inoculation. Tous les cobayes, sauf les derniers ayant reçu le sang après vingt-six jours, sont infectés, avec une incubation de cinq à sept jours. Donc, chez ce chien, l'infection sanguine révélée par la transfusion du sang n'a pas duré un mois. Il est sacrifié le trentième jour : son cerveau inoculé à un cobaye ne l'infecte pas. Le quatrième et dernier chien adulte n'a montré aucun signe d'infection : l'examen microscopique journalier du sang ne montre aucun spirochète ; le sang, prélevé quatorze jours après l'inoculation, n'infecte pas 2 cobayes ; le chien étant sacrifié un mois après l'inoculation, son cerveau n'infecte pas 1 cobaye (observé pendant plus d'un mois et demi).

En résumé, sur 4 chiens adultes inoculés, 1 se montre réfractaire et 3 ont une infection latente d'emblée : pas de spirochètes visibles dans le sang, mais le sang inoculé à des cobayes les infecte. Chez l'un de ces chiens, saigné tous les huit jours, on constate que l'infection sanguine dure entre dix-neuf et vingt-six jours ; sacrifié le trentième jour, son cerveau n'infecte pas 1 cobaye.

POULE. — La poule a été sensible, dans 3 cas sur 4, à une souche algérienne. Le sang de la quatrième poule, prélevé à

trois reprises : les cinquième, douzième et dix-neuvième jours après l'inoculation et inoculé à 5 cobayes, ne les infecte pas. Le cerveau de la même poule, sacrifiée au trentième jour, n'infecte pas 1 cobaye. Au contraire, le sang des 3 autres poules a été infectant pour les cobayes, sans avoir jamais montré de spirochètes à l'examen microscopique. Chez la première poule, du sang prélevé le treizième jour a donné à 1 cobaye une infection normale après dix-sept jours d'incubation et, à 1 autre cobaye, une infection faible après deux jours d'incubation. Le sang de la deuxième poule, prélevé le douzième jour après l'inoculation, infecte 1 cobaye après vingt-sept jours d'incubation. La troisième poule est saignée tous les huit jours ; le sang, prélevé le cinquième jour après l'inoculation n'infecte pas 1 cobaye ; prélevé le douzième jour, il donne à 1 cobaye une forte infection après une incubation de sept jours ; prélevé le dix-neuvième jour, il donne à 1 cobaye une infection fugace après une incubation de vingt-huit jours ; prélevé le vingt-sixième jour, il n'infecte plus le cobaye. Le cerveau de la même poule, sacrifiée un mois et demi après son inoculation, inoculé à 1 cobaye, ne l'infecte pas. Chez cette poule, le virus n'a donc existé dans le sang à dose infectante qu'après le cinquième jour qui a suivi l'inoculation et en a disparu après trois semaines environ.

En résumé, dans les 3 cas positifs (sur 4 essais), le sang de la poule ne montre jamais de spirochètes à l'examen microscopique, mais, inoculé à des cobayes, il les infecte.

\*  
\* \*

En conclusion, les caractères pathogènes des souches algériennes de *Sp. hispanicum* expérimentées répondent, dans leur ensemble, à ceux des autres souches nord-africaines, étudiées par Ch. Nicolle et Ch. Anderson, P. Remlinger et J. Bailly, H. Velu, L. Balozet et G. Zottner, P. Delanoë. Même action pathogène sur le cobaye, le lapin, la souris, le singe. Nous notons, de plus, que le chien et la poule sont, généralement, sensibles à l'inoculation sous-cutanée et que, chez le cobaye, le *Sp. hispanicum* de souche algérienne passe dans le lait. Nous signalons la courbe à deux clochers de l'accès parasitaire aigu de première invasion chez le cobaye.



## B. — INOCULATION DU VIRUS DANS LE DERMÉ.

2 cobayes, qui reçoivent dans le derme 2/10<sup>e</sup> de cent. cube d'une dilution, au 1/20 dans le premier cas, au 1/40<sup>e</sup> dans le deuxième cas, de sang infecté citraté, contractent une infection normale, comme leurs témoins, qui reçoivent les mêmes doses sous la peau.

## C. — INGESTION DU VIRUS.

Un cobaye, à qui on fait ingérer 3 cent. cubes. 5 de sang d'un cobaye infecté, fait une infection normale, comparable à l'infection moyenne des cobayes témoins.

## IV

## ESSAIS DE VACCINATION.

## ESSAIS DE TRAITEMENT MÉDICAMENTEUX

## I. — Essais de vaccination.

A. — ESSAIS DE VACCINATION PAR DU VIRUS VIEILLI *in vitro*  
A DIVERSES TEMPÉRATURES.

Du sang de cobaye à spirochètes, additionné à parties égales d'eau citratée à 5 p. 100, et conservé à 14°-20°, n'infecte plus le cobaye après cinq semaines (trente-six jours, quarante jours, soixante jours).

Conservé à 0°, il n'infecte plus le cobaye après sept semaines (sept semaines, huit semaines).

Conservé à -10°, il n'infecte plus le cobaye après deux jours (deux, trois, cinq, sept, quatorze, vingt-et-un jours).

Les 16 cobayes qui ont reçu du sang non infectant, réinoculés un mois plus tard avec du virus frais, ont présenté une infection normale.

En conclusion, du virus tué par le vieillissement *in vitro* dans du sang citraté à diverses températures ne vaccine pas contre une inoculation virulente.

## B. — ESSAIS DE VACCINATION PAR DU VIRUS BILIÉ.

Du sang contenant 30 spirochètes par champ de goutte épaisse est dilué au  $1/20^{\circ}$  dans une solution de citrate de soude à 5 p. 100. Une goutte de cette dilution est versée dans 1 cent. cube de bile de bœuf stérilisée et le mélange est laissé dix minutes à la température du laboratoire. 1 cent. cube du mélange, où le sang est donc dilué au  $1/20^{\circ}$ , est ensuite inoculé sous la peau à 2 cobayes, en même temps que 2 cobayes-témoins reçoivent 1 cent. cube de la dilution en eau citratée, sans bile.

Selon la même technique, 2 autres cobayes reçoivent sous la peau 2 cent. cubes d'un mélange de virus et de bile, où le sang est dilué au  $1/800^{\circ}$  (2 témoins reçoivent le même virus non bilié).

Résultat : les cobayes qui ont reçu le virus bilié, dilué au  $1/20$  ou au  $1/800^{\circ}$ , ne sont pas infectés.

Ils ne sont pas vaccinés non plus, car réinoculés avec une souche virulente, ils font une infection normale.

## II. — Essais de traitement.

## A. — TRAITEMENT PAR LE SÉRUM D'ESPÈCES ANIMALES RÉFRACIAIRES.

Le porc et l'âne s'étant montrés réfractaires à l'infection expérimentale par les souches algériennes de *Sp. hispanicum*, on a voulu voir si leur sérum a une action sur l'infection du cobaye.

SÉRUM DE PORC. — 4 cobayes, inoculés de *Sp. hispanicum*, reçoivent 5 cent. cubes de sérum normal de porc, les 2 premiers au deuxième jour de leur accès, les 2 autres au troisième jour de leur accès.

Chaque fois, l'injection de sérum est suivie de la disparition brusque des spirochètes du sang périphérique. Quand il repa-  
raissent, ils sont moins nombreux que chez les témoins.

SÉRUM D'ÂNE. — Deux injections de 5 cent. cubes de sérum normal d'âne (deux jours de suite), n'ont produit aucun résul-

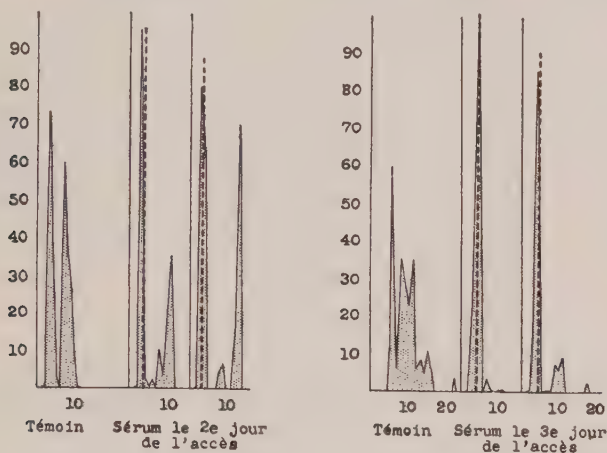


FIG. 3. — Effet de l'injection de 5 cent. cubes de sérum normal de porc.

tat sur l'infection d'un cobaye, comparée à celle de son témoin.

#### B. — TRAITEMENT PAR LE NOVARSÉNOBENZOL.

L'inefficacité du traitement arsenical dans la fièvre récurrente hispano-nord-africaine de l'homme est un caractère classique de cette maladie. Le tableau et les graphiques ci-joints montrent que le novarsénobenzol, à la dose de 4 centigrammes pour un cobaye de 300 grammes, a agi nettement

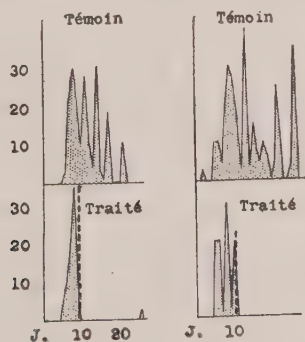


FIG. 4. — Injection de fortes doses d'arsénobenzol: 0 gr. 04, le sixième jour de l'accès, à 2 cobayes dont les spirochètes disparaissent, et qui ne sont pas intoxiqués; 4 autres cobayes dans les mêmes conditions meurent d'intoxication.



SOUCHE de <i>Sp. hispanicum</i>	DOSE de novarsénobenzol en grammes	JOUR DE L'ACCÈS où le novarsénobenzol est injecté	RÉSULTATS	
			Sur les parasites	Toxique
Aïn Taya . . .	0.04	9°	Disparaissent.	Mort après 6 jours.
Kouba . . . .	0,04	6°	Disparaissent.	Guéri.
Tique . . . .	0,04	7°	Disparaissent.	Guéri.
Chiffalo . . .	0,04	6°	Disparaissent.	Mort après 3 jours.
Aïn Taya . . .	0,04	2°	Disparaissent.	Mort après 4 jours.
Chiffalo . . . .	0,04	4°	Disparaissent.	Mort après 2 jours.
Tique . . . .	0,0007	2°	Disparaissent 5 jours.	0
	0,0014	3°		
Aïn Taya . . .	0,0007	4°	Disparaissent 4 jours.	0
	0,0014	5°		
Chiffalo . . . .	0,0007	6°	Disparaissent 4 jours.	0
	0,0014	7°		

contre l'infection expérimentale, mais cette dose s'est montrée toxique et a tué 4 cobayes sur 6 en trois ou quatre jours.

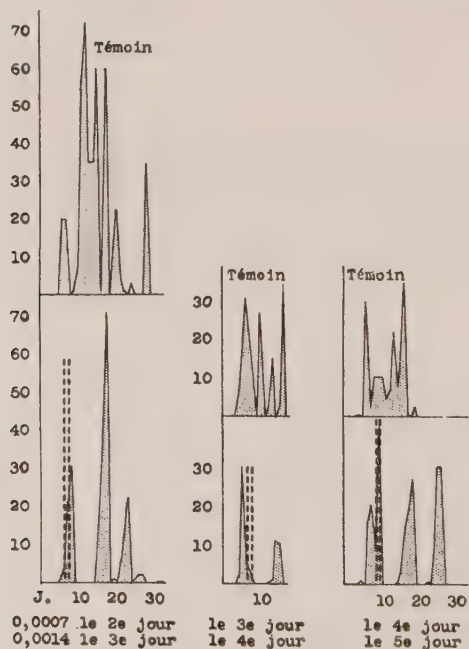


FIG 5. — Injection de novarsénobenzol à faibles doses deux jours de suite au cours de l'accès.

Des doses beaucoup moins fortes ont été bien supportées : 7/10<sup>e</sup> de milligramme et 1 milligr. 4 injectés deux jours de suite au cours de l'accès (deuxième et troisième jours, ou troisième et quatrième jours, ou quatrième et cinquième jours). Chaque fois, les spirochètes ont disparu complètement du sang périphérique pendant quatre ou cinq jours après la deuxième injection, mais des rechutes parasitaires se sont ensuite produites.

## V

### INFECTION LATENTE ET PRÉMUNITION

Nous avons signalé dans un chapitre précédent que l'examen systématique du sang d'Indigènes algériens, que l'on pratique pour les enquêtes épidémiologiques relatives au paludisme, révèle parfois la présence parmi eux de porteurs sains de spirochètes, qui vaquent à leurs occupations et à leur travail sans aucun signe de maladie. L'infection latente à spirochètes existe donc chez l'homme.

Il existe de même chez le cobaye inoculé expérimentalement une infection latente métacritique à *Sp. hispanicum*.

Les cobayes inoculés avec les souches algériennes de *Sp. hispanicum*, au nombre de plus de 2.100, ont tous présenté, après une incubation de deux à trois jours, un accès aigu fébrile et parasitaire. Parmi ceux que l'on a sacrifiés dans les mois qui ont suivi, un grand nombre de cobayes étaient encore porteurs de germes virulents.

D'autre part, un cobaye qui a terminé son accès aigu de fièvre récurrente hispano-nord-africaine de primo-infection résiste à une nouvelle atteinte ; une réinoculation pratiquée au cours des mois qui suivent l'accès de première invasion ne provoque pas chez lui d'accès aigu fébrile, ni d'accès parasitaire, tant qu'il reste infecté. La récurrente hispano-nord-africaine est donc une maladie à prémunition.

Nous avons recherché expérimentalement la durée de l'infection latente et celle de la prémunition chez le cobaye.

## I. — Durée de l'infection latente.

Pour déceler l'infection latente de *Sp. hispanicum* chez le cobaye, nous avons employé le procédé classique d'inoculation du cerveau d'anciens infectés à des animaux neufs et sensibles.

Dès que le cobaye est sacrifié, le cerveau et le cervelet sont prélevés, lavés abondamment dans l'eau salée à 9 p. 1.000 stérile, broyés dans un flacon à billes de verre dans un peu d'eau salée. On inocule 3 cent. cubes de l'émulsion à un cobaye dans le péritoine et 3 cent. cubes à un autre cobaye sous la peau.

Résultat des inoculations de cerveau d'anciens infectés  
qui ont terminé leur accès depuis moins d'un an.

SOTCHE	DÉLAI entre la défervescence de l'accès aigu et le sacrifice	RÉSULTAT	DURÉE DE L'ACCÈS
Chiffalo . . . . .	4 mois.	+	15 jours.
Chiffalo . . . . .	4 mois.	+	Plus de 18 jours.
Chiffalo . . . . .	4 mois.	0	
Chiffalo . . . . .	4 mois.	0	
Chiffalo . . . . .	4 mois 1/4.	0	
Chiffalo . . . . .	4 mois 1/4.	0	
Kouba . . . . .	4 mois 1/4.	+	18 jours.
Kouba . . . . .	4 mois 1/4.	+	18 jours
Chiffalo . . . . .	4 mois 1/2.	0	
Chiffalo . . . . .	4 mois 1/2.	+	5 jours mort.
Kouba . . . . .	5 mois 1/2.	+	17 jours.
Kouba . . . . .	5 mois 1/2.	+	14 jours mort.
Chiffalo . . . . .	6 mois.	0	
Chiffalo . . . . .	6 mois.	0	
Chiffalo . . . . .	6 mois 3/4.	+	12 jours.
Chiffalo . . . . .	6 mois 3/4.	0	
Kouba . . . . .	6 mois 3/4.	0	
Kouba . . . . .	6 mois 3/4.	0	
Kouba . . . . .	7 mois.	+	15 jours.
Kouba . . . . .	7 mois.	+	16 jours.
Kouba . . . . .	7 mois 1/2.	0	
Kouba . . . . .	7 mois 1/2.	+	18 jours.
Chiffalo . . . . .	8 mois.	0	
Chiffalo . . . . .	8 mois.	0	
Chiffalo . . . . .	8 mois 1/2.	+	10 jours.
Chiffalo . . . . .	8 mois 1/2.	+	14 jours.
Chiffalo . . . . .	9 mois 3/4.	0	
Chiffalo . . . . .	9 mois 3/4.	0	



Les cerveaux de 18 autres cobayes qui ont terminé leur accès parasitaire depuis plus d'un an (treize mois, seize mois, vingt mois, vingt-cinq mois, vingt-sept mois, vingt-huit mois), inoculés à des cobayes neufs, ne les infectent pas.

En résumé, l'infection latente par les souches algériennes de *Sp. hispanicum* peut persister, dans le cerveau du cobaye, plus de neuf mois.

## II. — Prémunition raciale et prémunition spécifique. Leur durée.

Les souches algériennes de *Sp. hispanicum* conservées sur cobayes au laboratoire sont au nombre de quatre : 1°) une souche d'origine humaine isolée le 6 juin 1933 d'un malade à Chiffalo, village maritime à 48 kilomètres à l'ouest d'Alger (16) [souche Chiffalo] ; 2°) une souche isolée le 23 août 1933 de tiques de l'espèce *Rhipicephalus sanguineus* prélevées sur le chien du malade précédent (souche tiques) ; 3°) une souche isolée le 29 août 1933 d'un cas humain de Kouba, village de la proche banlieue d'Alger [souche Kouba] (17) ; 4°) une souche isolée le 28 août 1936 d'un cas humain d'Aïn Taya, village maritime à 30 kilomètres à l'est d'Alger.

Ces 4 souches ont été comparées entre elles au moyen de l'épreuve des réinoculations croisées suivant la technique de Laveran et Mesnil (18) dont nous rappelons le principe : Si des animaux prémunis contre le virus A restent sensibles au virus B et si *en même temps* des animaux prémunis contre le virus B restent sensibles au virus A, on peut conclure que les deux virus appartiennent à deux espèces distinctes. L'expérience doit être croisée : virus A sur animaux B et, au même moment, virus B sur animaux A. On ne peut tirer aucune conclusion d'une expérience unilatérale, si le résultat en est positif. Par exemple : virus A contaminant des animaux à virus B. Cette expérience ne prouve pas à elle seule que les

(16) A. SERGENT, A. MANCEAUX et R. BALLISTE. *Loc. cit.*

(17) A. SERGENT et H. LÉVY. *Loc. cit.*

(18) Voir *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 13, septembre 1935, p. 297.

deux virus A et B sont d'espèces différentes : il se peut qu'ils appartiennent à la même espèce, et que la souche A soit simplement plus virulente que la souche B. Le doute est levé par le résultat de la seconde expérience croisée (virus B inoculé à des animaux à virus A), car, dans l'hypothèse énoncée ci-dessus d'une souche A plus forte que la souche B, cette souche B ne contaminera pas les animaux A. En somme, l'épreuve des inoculations croisées n'a de valeur probante qu'autant qu'elle est bilatérale et basée sur des opérations

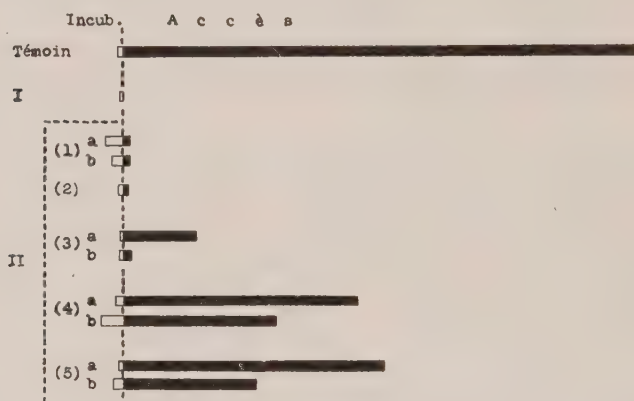


FIG. 6. — *Indices parasitaires moyens*. — I, prémunition conférée par une souche contre elle-même; II, prémunition conférée par une souche contre une autre souche; (1), a, Kouba-Chiffalo, b, Chiffalo-Kouba; (2), Tiques-Kouba; (3), a, Chiffalo-Tiques, b, Tiques-Chiffalo; (4), a, Chiffalo-Aïn Taya, b, Aïn Taya-Chiffalo; (5), a, Kouba-Aïn Taya, b, Aïn Taya-Kouba.

contemporaines, dont les doubles résultats doivent concorder, c'est-à-dire être tous deux positifs ou tous deux négatifs.

Il faut, d'autre part, différencier la prémunition d'ordre spécifique de la prémunition d'ordre racial (19).

Les expériences ont donc consisté à réinoculer des cobayes ayant terminé leur accès parasitaire de primo-infection depuis des espaces de temps variant de une semaine à vingt-neuf mois. Dans une première série d'essais on a inoculé la même souche que celle de la primo-infection, pour mesurer la prémunition raciale. Une seconde série d'essais, portant sur la pré-

(19) Voir *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 13, septembre 1935, p. 297-299.

munitiōn spécifique, était double : inoculation de la souche B à des cobayes anciens infectés de A et inoculation de la souche A à des cobayes anciens infectés de B, avec des témoins de chaque sorte. Ainsi 135 cobayes anciens infectés ont été réinoculés, en même temps que 39 témoins.

Pour condenser les résultats d'expériences portant sur de nombreux animaux placés dans des conditions diverses, nous utilisons ce que nous avons appelé l'*indice parasitaire*. L'indice parasitaire d'un accès de spirochètose est la somme des nombres moyens de spirochètes comptés chaque jour, dans un champ d'objectif à immersion (obj. 4/13 Stiassnie, oc. comp. 4) de goutte épaisse de sang, pendant les trente jours qui suivent l'inoculation du sujet. Dans chaque expérience on établit l'*indice parasitaire moyen* des témoins et celui des sujets expérimentés.

Les diagrammes ci-joints montrent les résultats obtenus : une souche algérienne de *Sp. hispanicum* prémunit contre elle-même et la durée de cette *prémunitiōn raciale* peut dépasser deux ans.

Les expériences ont montré ensuite, comme il est figuré sur les mêmes diagrammes, qu'une souche algérienne de *Sp. hispanicum* prémunit contre d'autres souches algériennes (d'origine humaine ou provenant de rhipicéphales), mais que cette *prémunitiōn spécifique* est moins forte que la prémunitiōn raciale. La prémunitiōn que confère une souche contre une autre souche empêche rarement d'une façon complète une réaction aiguë, mais cette réaction est moins intense que celle des témoins : ce sont des « accès de prémunis ». Les « accès de prémunis » ont une durée et une intensité très inférieures à celles des accès des cobayes neufs inoculés au même moment avec le même virus (20).

Le degré d'intensité de la prémunitiōn spécifique varie suivant les souches que l'on compare entre elles. Le diagramme montre par exemple que la souche Kouba prémunit très fortement contre la souche Chiffalo (et inversement), tandis que la même souche Kouba prémunit bien moins fortement contre la souche Aïn Taya (et inversement).

(20) Pour les « accès de prémunis », voir *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 15, juin 1937, p. 139.



L'inégalité du pouvoir prémunissant des diverses souches dépend peut-être de différences dans leur virulence, ainsi que de différences dans le nombre de passages subis par les souches au laboratoire chez le cobaye depuis le moment où elles ont été isolées de leurs hôtes naturels.

C'est ainsi que si l'on compare par les réactions aux réinoculations croisées, en janvier 1937, la souche Aïn Taya (isolée du sang humain depuis cinq mois) et la souche Kouba (isolée de l'homme depuis un an et cinq mois) on constate que les accès parasitaires de réinoculation, tout en étant moins forts que les accès de primo-inoculation des témoins neufs, sont assez marqués. Les mêmes souches sont de nouveau comparées l'une à l'autre un an et quatre mois plus tard, à un moment où la souche Aïn Taya a passé par le cobaye depuis un an et

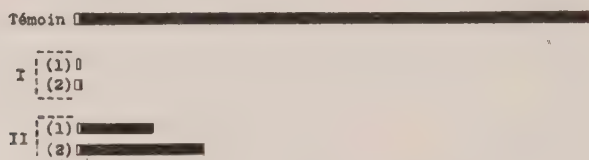


FIG. 7. — Indices parasitaires moyens après un an et après deux ans et demi de prémunition. — I, prémunition conférée par une souche contre elle-même : (1), un an après l'accès de primo-infection; (2), deux ans et demi après l'accès de primo-infection; II, prémunition conférée par une souche (Chiffalo) contre une autre souche (Tiques) : (1), un an après l'accès de primo-infection; (2), deux ans et demi après l'accès de primo-infection.

neuf mois et la souche Kouba depuis deux ans et neuf mois : on constate que les deux souches prémunissent beaucoup mieux l'une contre l'autre que dans les expériences précédentes. On remarque qu'à cet accroissement du pouvoir prémunissant croisé correspond un fait : une plus grande durée de la vie parasitaire des 2 souches de spirochètes chez des hôtes appartenant à la même espèce animale, le cobaye.

En résumé :

L'infection latente métacritique peut durer au moins neuf mois chez le cobaye inoculé au laboratoire.

La prémunition raciale que confère contre elle-même une primo-infection expérimentale par une souche algérienne de *Sp. hispanicum* est forte et peut durer au moins deux ans

chez le cobaye. Elle est accompagnée d'une prémunition spécifique qui est moins intense que la prémunition raciale. Mais cette prémunition spécifique est réelle, et se traduit par l'« avortement » total ou partiel des accès consécutifs aux réinoculations. Ces accès, quand ils surviennent, ont le caractère d'« accès de prémunis. »

## VI

### THÉRAPEUTIQUE PAR LE SÉRUM DE CONVALESCENTS. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE (21)

Nous avons vu précédemment, par l'étude de 4 souches de *Sp. hispanicum* d'Algérie, dont trois d'origine humaine et une provenant de rhipicéphales du chien, que chaque souche prémunit solidement contre elle-même et prémunit aussi, à un moindre degré, contre les autres souches de la même espèce.

Nous avons recherché expérimentalement si le sérum de convalescents d'animaux en état de prémunition avait une action préventive et une action curative sur l'infection à spirochètes. L'intérêt d'une thérapeutique par le sérum de convalescents est d'autant plus marqué dans la fièvre récurrente hispano-nord-africaine que les arsenicaux, si actifs contre les autres spirochètoses, sont sans effet sur celle-ci.

Les souches algériennes de *Sp. hispanicum* dont nous disposons se prêtent remarquablement à l'expérimentation des agents thérapeutiques. Sur plus de 2.100 cobayes inoculés, aucun ne s'est montré réfractaire et tous ont présenté une infection fort régulière. Les témoins faits spécialement pour les expériences de sérothérapie ont montré, après une incubation de deux jours en moyenne, un accès fébrile et parasitaire de vingt jours, avec le double clocher de la courbe parasitaire que nous avons déjà signalé, l'un le cinquième jour, l'autre le neuvième jour, puis une infection latente métacritique avec petites rechutes parasitaires.

(21) Note préliminaire in *Bull. Acad. Méd.*, **115**, 17 mars 1936, p. 463.

### Pouvoir spirochéticide *in vitro* du sérum de convalescents.

Avant de rechercher l'action *in vivo* du sérum de convalescents, nous avons étudié son pouvoir spirochéticide *in vitro*.

On mélange, à parties égales, du sang de cobayes comptant 40 spirochètes par champ microscopique de goutte épaisse et du sérum de convalescents. On inocule aussitôt ce mélange à 2 cobayes, à la dose de 2 cent. cubes ; d'autre part, après une heure de contact, on inocule la même dose à 2 autres cobayes.

Un premier lot de témoins est constitué par 4 cobayes, qui reçoivent des spirochètes mêlés à du sérum de cobaye sain : 2 reçoivent le mélange dès qu'il est préparé, 2 autres le mélange après une heure de contact.

Enfin, un deuxième lot de témoins est formé de 4 cobayes qui reçoivent le virus pur sans sérum.

Les 4 cobayes qui ont reçu le mélange virus + sérum de convalescents, soit extemporané, soit après une heure de contact, ne montrent jamais de spirochètes ni de fièvre. Eprouvés par une inoculation de virus un mois plus tard, ils font tous quatre un accès aigu typique fébrile et parasitaire. La première inoculation de virus + sérum de convalescents ne les avait donc pas prémunis.

Au contraire, le mélange de virus et de sérum de cobayes sains, soit extemporané, soit après une heure de contact, donne aux 4 cobayes une infection normale, aussi marquée que celle des 4 cobayes neufs témoins.

En conclusion, le sérum de convalescents de spirochétose hispano-nord-africaine possède un pouvoir spirochéticide marqué *in vitro*. A cet égard *Sp. hispanicum* se comporte comme tous les spirochètes pathogènes connus.

### Action anti-infectieuse *in vivo* du sérum de convalescents.

#### I. — ACTION NULLE DU SÉRUM NORMAL DE COBAYE.

Une question préalable doit être résolue : le sérum normal de cobaye possède-t-il *in vivo* une action contre les spirochètes ?



Dans une expérience préliminaire, on a vérifié que le sérum de cobayes sains est dépourvu de toute propriété préventive ou curative. Le résultat est net : les cobayes qui reçoivent du sérum de cobayes neufs (5 cent. cubes sous la peau) font des

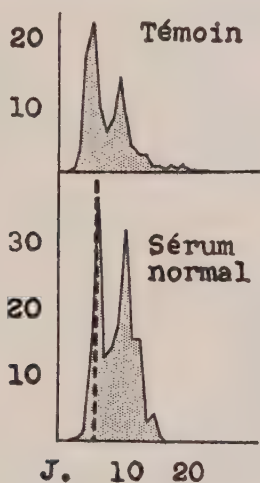


FIG. 8. — Essai de sérumisation par du sérum normal de cobaye injecté le troisième jour de l'accès : aucun effet.

accès aigus typiques dont la durée et l'intensité sont égales à celles des accès des cobayes témoins non sérumisés.

## II. — ACTION DU SÉRUM DE CONVALESCENTS INJECTÉ A TITRE PRÉVENTIF.

La dose de virus inoculé est de 1 cent. cube de sang prélevé à un animal en accès parasitaire. La dose de sérum de convalescent injecté sous la peau est fixée, après des essais préliminaires, à 5 cent. cubes. Le sérum de convalescent utilisé est un mélange de sérum de plusieurs cobayes saignés dans les premières semaines de la convalescence.

Le sérum a été injecté la veille, le jour même, ou le lendemain de l'inoculation infectieuse.

16 cobayes sont inoculés avec le virus. Parmi eux, 5 sont laissés sans traitement et servent de témoins. 3 autres

cobayes reçoivent du sérum la veille, 5 le jour même, et 3 le lendemain de l'inoculation.

Les trois catégories de sujets sérumisés préventivement réagissent de même comme le montrent les diagrammes :

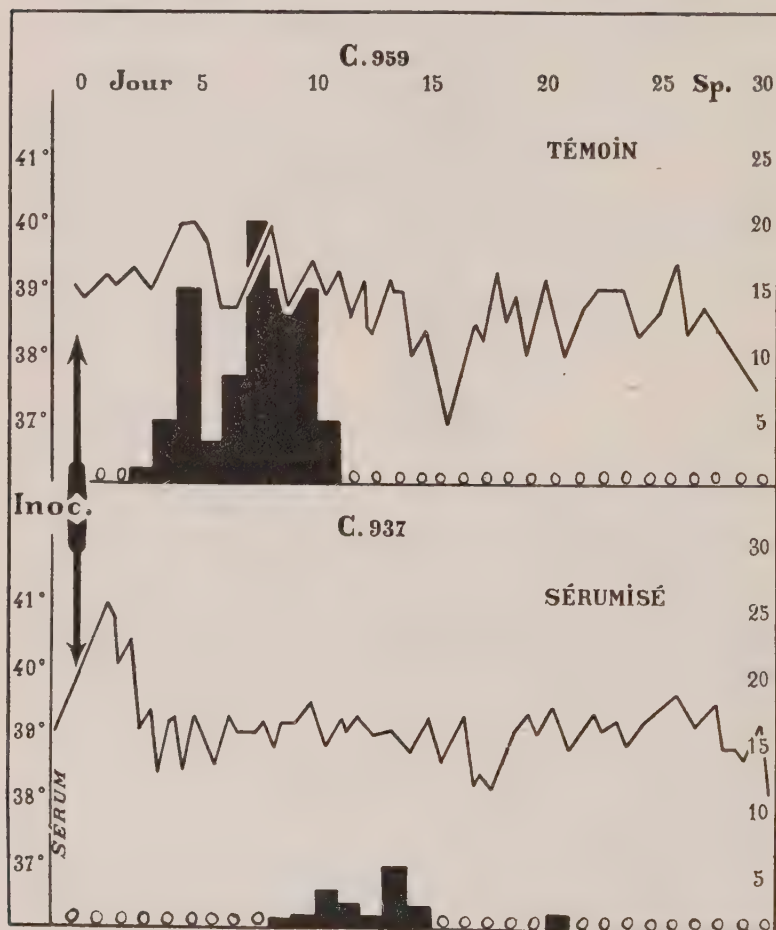


FIG. 9. — Courbe typique montrant l'action préventive du sérum de convalescents injecté la veille du jour de l'inoculation.

Le sérum ne supprime pas l'accès ;  
 Il le retarde (incubation plus longue) ;  
 Il le rend moins intense (spirochètes moins nombreux dans le sang, disparaissant même certains jours, de sorte que l'accès

parasitaire est coupé de courtes rémissions qui n'existent pas chez les témoins).

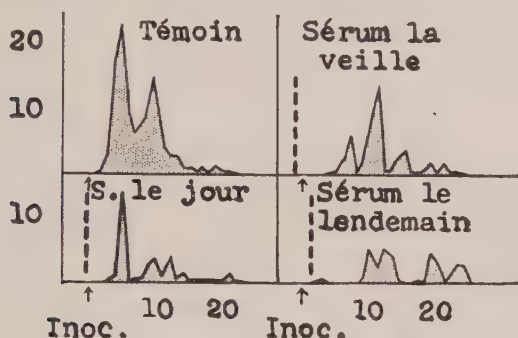


FIG. 10. — Action préventive du sérum de convalescents injecté la veille, ou le jour même, ou le lendemain de l'inoculation des spirochètes.

En bref, le sérum donné à titre préventif n'empêche pas l'accès, il le retarde et l'atténue.

### III. — ACTION DU SÉRUM DE CONVALESCENTS INJECTÉ A TITRE CURATIF.

Le sérum a été injecté à des moments divers après le début de l'accès aigu parasitaire.

71 cobayes sont inoculés avec *Sp. hispanicum*, 25 d'entre eux, laissés sans traitement, servent de témoins. 7 reçoivent du sérum le premier jour de l'accès, 4 le deuxième jour, 29 le troisième jour et 6 le quatrième jour (voir les diagrammes).

Le sérum injecté le premier jour de l'accès retarde l'apparition des clochers parasitaires de l'accès, comme le sérum injecté pendant l'incubation.

Lorsque le sérum est injecté en plein accès (après le deuxième jour d'accès), il provoque dans les vingt-quatre ou trente-six heures une chute brusque de la température et du nombre des parasites. Ceux-ci disparaissent même quelquefois définitivement ou bien ne reparaissent que de loin en loin, donnant de faibles rechutes parasitaires. Le sérum coupe l'accès fébrile et l'accès parasitaire quel que soit le jour où



il est injecté, et avance le début de la période d'infection latente. La suppression des rechutes parasitaires est d'autant plus complète que l'intervention sérothérapique est plus tardive au cours de l'accès.

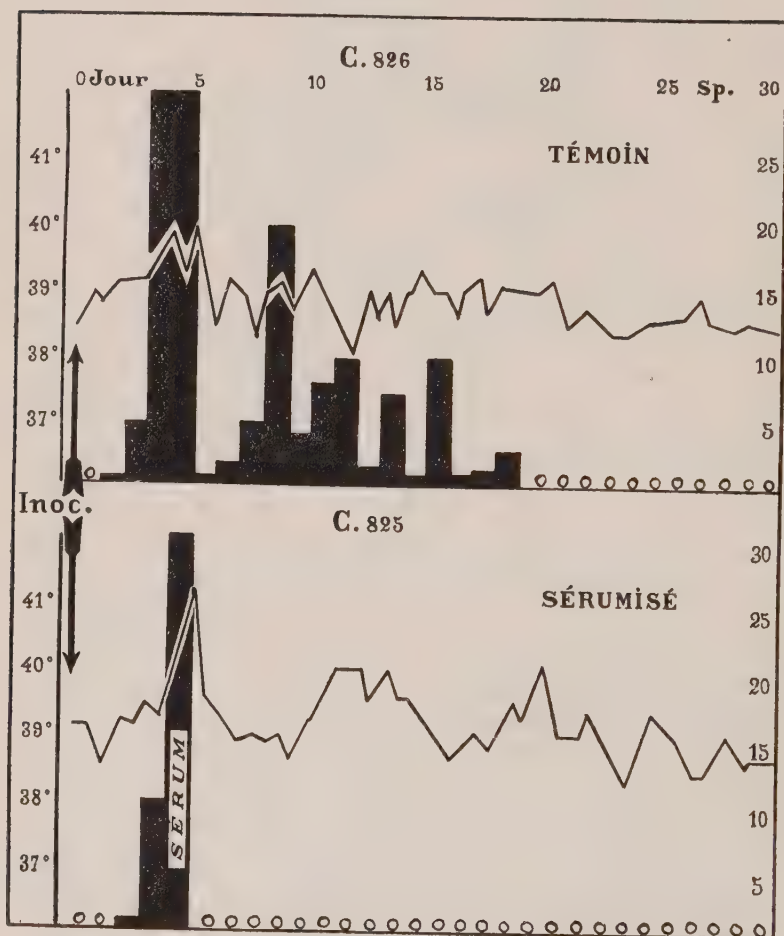


FIG. 11. — Courbe typique montrant l'action curative du sérum de convalescents injecté le troisième jour de l'accès parasitaire.

Le sérum injecté au moment où la courbe parasitaire dessine son premier clocher (troisième et quatrième jour de l'accès) supprime l'apparition du deuxième clocher. C'est à ce moment,

au troisième ou quatrième jour de l'accès, que l'injection de

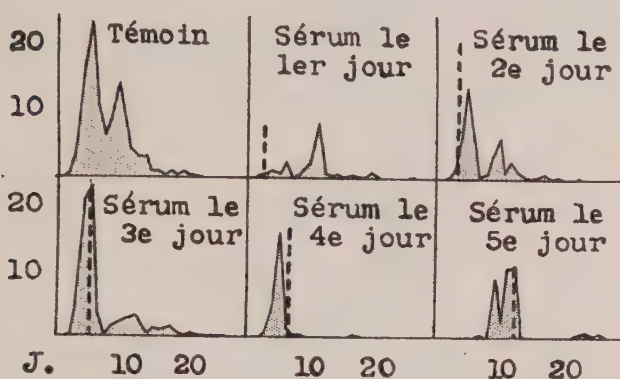


FIG. 12. — Action curative du sérum de convalescents selon le jour de son injection au cours de l'accès.

sérum est la plus utile, pour conférer sans risques la prémunition.

#### IV. — A QUEL MOMENT DE LA CONVALESCENCE

LE SÉRUM POSSÈDE-T-IL LA PLUS GRANDE VALEUR THÉRAPEUTIQUE ?

Le sang a été prélevé après la défervescence dans les délais suivants : huit jours, un mois, deux mois, trois mois, quatre mois, six mois, huit mois, neuf mois. Les cobayes d'épreuve, qui ont tous été inoculés avec 1 cent. cube du même sang infectieux, reçoivent l'injection de sérum le troisième jour de leur accès parasitaire. Des témoins en égal nombre sont laissés sans traitement.

L'examen des diagrammes ci-joints montre que les sérums peuvent être classés en trois catégories d'après leur action.

Celle-ci est excellente avec le sérum prélevé dans les huit jours qui suivent la fin de l'accès parasitaire : le deuxième clocher subintrant de l'accès parasitaire aigu est quasi supprimé.

Elle est bonne avec le sérum prélevé du premier au troisième mois après la défervescence, avec une valeur décroissante à mesure qu'augmente le délai. C'est ainsi que le nombre des parasites diminue presque immédiatement à la suite de l'injec-

tion d'un sérum prélevé dans la première semaine ou dans le premier mois de la convalescence, tandis que l'injection de sérum de deux mois ou de plus de deux mois n'arrête pas l'augmentation du nombre de parasites, qui ne commence à diminuer que le lendemain.

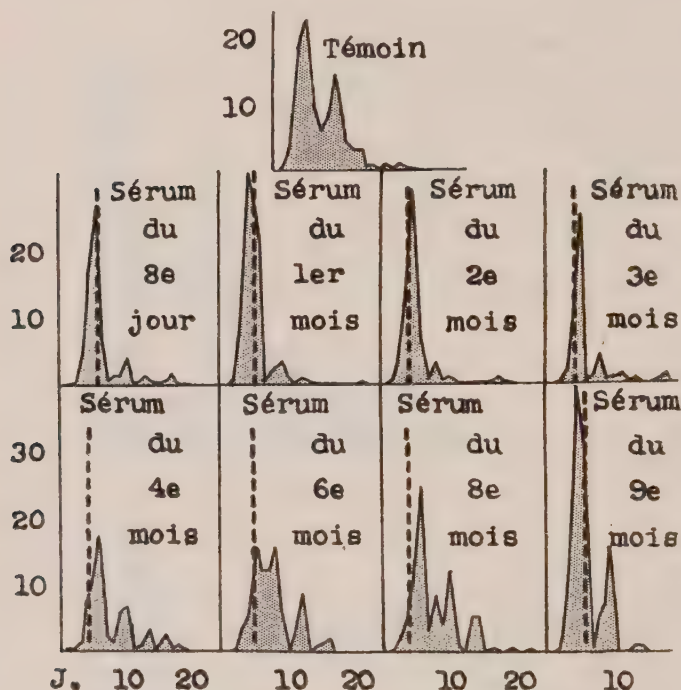


FIG. 13. — Action curative du sérum de convalescents selon la date de prélèvement de ce sérum.

Elle est médiocre ou nulle avec les sérums prélevés de quatre à neuf mois après la défervescence.

#### V. — DOSES A INJECTER.

On a expérimenté des doses de 1, 2, 3, 4, 5 cent. cubes inoculées à des cobayes de 300 grammes au troisième jour de leur accès parasitaire.

Six lots de 3 cobayes sont sérumisés :

Le premier lot reçoit 1 cent. cube de sérum, le deuxième lot



2 cent. cubes, le troisième lot 3 cent. cubes, le quatrième lot 4 cent. cubes, le cinquième lot 5 cent. cubes en une fois, le sixième lot 5 cent. cubes en trois fois. Le septième lot n'est pas traité et sert de témoin.

Pour égaliser autant que possible les conditions de l'expérience, étant donné que l'incubation n'est pas la même chez

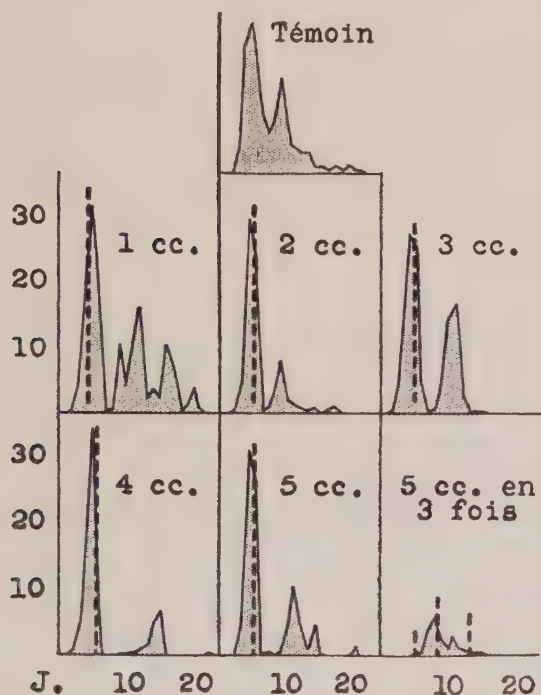


FIG. 14. — Action curative du sérum de convalescents selon la dose injectée le troisième jour de l'accès.

tous les cobayes, on range dans le premier lot le premier cobaye qui montre des spirochètes, dans le deuxième lot le deuxième cobaye chez qui apparaissent les spirochètes, et ainsi de suite.

L'action du sérum est nettement d'autant plus efficace que la dose est plus forte, comme le montrent les diagrammes. Alors qu'après l'injection de 1 cent. cube la courbe parasitaire continue à monter jusqu'au lendemain, à partir de la dose de

2 cent. cubes le nombre des parasites commence à diminuer peu après la sérumisation.

**DOSES FRACTIONNÉES.** — Si, au lieu d'injecter la dose de 3 cent. cubes de sérum en une seule fois au cobaye pendant l'accès, on l'injecte en trois fois (1 cent. cube, 2 cent. cubes, 2 cent. cubes), à quatre ou cinq jours d'intervalle à partir du jour où apparaissent les spirochètes, on obtient une atténuation nette de l'accès, sans le couper comme avec une dose unique massive. Le parasitisme n'est jamais intense dans le sang, mais il persiste pendant huit ou dix jours sans présenter de rémissions. Ce procédé pourrait être utile pour conférer la prémunition avec le moindre risque.

En résumé, l'action du sérum est proportionnelle à la dose injectée.

#### VI. — CONSIDÉRATIONS SUR L'ACTIVITÉ DU SÉRUM DE PRÉMUNIS DANS LES MALADIES A PRÉMUNITION.

Les fièvres récurrentes sont des maladies à prémunition, car elles comportent une longue phase d'infection latente métacritique pendant laquelle les surinfections sont impossibles ; le virus de la fièvre récurrente hispano-nord-africaine a été retrouvé après plus d'un an dans le cerveau de cobayes parfaitement guéris en apparence (Pampana). Les épreuves de prémunition permettent de penser qu'il peut persister plus de deux ans. Il serait intéressant de chercher si l'infection latente et également la prémunition de la spirochétose hispano-nord-africaine chez l'homme et chez les animaux ne persistent pas encore plus longtemps.

La constatation de l'existence de propriétés curatives dans le sérum de cobayes à spirochètes suggère quelques réflexions qui peuvent s'appliquer aux maladies à prémunition en général.

1° Si l'on confronte les résultats des injections préventives de sérum à ceux des injections curatives, on voit que le sérum atteint son maximum d'efficacité lorsqu'il est injecté au plus fort de l'accès. A ce moment, son action vient s'ajouter à l'effort de réaction de défense de l'organisme, qui aboutit à la crise fébrile. L'influence du sérum est au contraire à son

minimum lorsqu'il est injecté avant la crise, au cours de l'incubation ou au moment de l'inoculation, c'est-à-dire lorsque l'action du sérum précède l'effort de l'organisme. Il semble même qu'injecté avant la crise, le sérum gêne la réaction de l'organisme et l'établissement de la prémunition, puisque régulièrement l'accès des sujets sérumisés préventivement est plus long, quoique plus faible, que l'accès des cobayes témoins.

2° Un autre caractère du traitement de la fièvre récurrente par le sérum de convalescents est que ce sérum vient de sujets infectés. Nous avons vu qu'il est d'autant plus actif qu'il est prélevé à une époque plus rapprochée de l'accès aigu de première invasion. C'est donc du sérum *de porteurs de germes*. Au contraire, dans les maladies à immunité vraie, telles que la rougeole ou la scarlatine, c'est du *sérum de guéri* que l'on emploie.

3° Le pouvoir anti-infectieux du sérum décroît assez vite au cours de la convalescence de la fièvre récurrente hispano-nord-africaine. Nous avons en effet constaté une différence nette entre l'efficacité du sérum prélevé dans la semaine qui suit l'accès aigu et l'efficacité du sérum prélevé après trois mois : cette rapide diminution du pouvoir du sérum chez les convalescents dans cette maladie à prémunition contraste avec la longue durée de l'activité du sérum des sujets guéris d'une maladie à immunité vraie.

En conclusion : 1° le sérum de convalescents a une action heureuse sur le cours de la fièvre récurrente hispano-nord-africaine expérimentale du cobaye. Il coupe l'accès fébrile et parasitaire.

C'est dans la semaine qui suit la fin de l'accès aigu que le sérum possède le plus fort pouvoir curatif. C'est à ce moment qu'il convient donc de prélever le sang aux convalescents.

C'est lorsqu'elle est faite au plus fort de l'accès que l'injection de sérum a l'action la plus nette. Chez les sujets exposés à des réinfections, il convient de ne pas pratiquer la sérumisation trop tôt, pour ne pas entraver l'établissement de la prémunition.

2° L'emploi du sérum de convalescents pour le traitement de la récurrente hispano-nord-africaine chez l'homme paraît



indiqué, et d'autant plus qu'à la différence de la fièvre récurrente à poux, la fièvre récurrente hispano-nord-africaine n'est pas justiciable du traitement par les arsenicaux, — qui peuvent même être dangereux, — et que la maladie est souvent grave, avec de nombreuses rechutes.

3° On peut donc envisager d'inscrire la fièvre récurrente hispano-nord-africaine sur la liste des maladies qui sont susceptibles de bénéficier d'un traitement par le sérum de convalescents.

# LES SPIROCHÈTES COMMENSAUX DE L'HOMME

(PREMIER MÉMOIRE)

par P. SEGUIN et R. VINZENT

Dans une série d'affections humaines, on rencontre, associés constamment à divers anaérobies (*B. fusiformes*, flore putride de Veillon, etc.) des spirochètes dont la seule présence suffit à caractériser le type bactériologique de la flore. C'est l'association fuso-spirillaire ou fuso-spirochétiqne des auteurs.

L'abondance des spirochètes dans les sécrétions pathologiques, leur pénétration souvent exclusive dans la profondeur des tissus (certaines lésions humaines ou expérimentales), l'action curative exercée par les arsénobenzols sont autant d'arguments qui ont amené maints bactériologistes à attribuer à ces organismes un pouvoir pathogène propre. Cette hypothèse se heurte cependant à deux objections importantes : tout d'abord, l'absence, dans les septicopyohémies, de foyers secondaires d'infection à spirochètes purs ; en second lieu, le fait que les cultures pures de spirochètes se montrent presque entièrement dépourvues de virulence pour l'animal.

Aussi, les travaux les plus modernes tendent-ils à subordonner le pouvoir pathogène des spirochètes à la double influence de l'association microbienne et du terrain.

Pour préciser ces conditions, il est indispensable d'obtenir, à partir d'une flore complexe donnée et dont le pouvoir pathogène global a été bien établi, des cultures pures des spirochètes et de leurs associés. Puis, cette analyse faite, chercher à réaliser les lésions caractéristiques de la flore, en inoculant à l'animal divers mélanges des cultures pures obtenues. Seul un long travail, fruit d'une étroite collaboration entre cliniciens et bactériologistes, peut permettre de résoudre le problème posé.

L'étude systématique des spirochètes commensaux de l'homme, malgré l'importance des travaux consacrés à ce

groupe d'organismes est encore à peine ébauchée. Si l'on s'en rapporte au plus récent ouvrage paru sur ce sujet : « Oral spirochetes and related organisms in fuso-spirochetal disease », on constate que l'auteur, D. Smith, malgré un louable effort, ne parvient pas à dégager une classification précise. Cela tient avant tout à ce que la plupart des descriptions qui ont été données étaient basées uniquement sur les caractères morphologiques, de rares espèces seulement ayant été cultivées à l'état de pureté.

Grâce à une technique un peu différente de celles des auteurs qui nous ont précédés dans ces recherches, nous disposons d'un nombre important de souches correspondant à des espèces variées. Afin d'apporter un peu de clarté, nous nous proposons de décrire successivement les différents types qui présentent des caractères distinctifs, tant biologiques que morphologiques suffisamment accusés. Au préalable, nous exposerons les procédés de culture qui nous ont permis d'obtenir, outre les espèces déjà cultivées, de nouvelles espèces qui n'avaient pu être obtenues à l'état pur jusqu'à présent.

### Techniques d'isolement et de cultures.

Les spirochètes commensaux de l'homme ont été l'objet de multiples tentatives de cultures. Celles-ci n'ont abouti le plus souvent, qu'à l'obtention de cultures impures. Les descriptions données, presque toujours rudimentaires et forcément inexactes, ne peuvent apporter aucune précision à la systématique. Nous n'analysons donc pas ici ces travaux, renvoyant pour la bibliographie, à l'excellent traité de A. Pettit.

#### TECHNIQUE DE NOGUCHI.

Noguchi fit connaître la première technique vraiment efficace, puisqu'elle lui permit de réussir à obtenir la culture pure de 3 espèces buccales (*Sp. microdentium*, *Sp. mucosum*, *Sp. macrodentium*) et de 4 espèces génitales (*Sp. refringens*, *Sp. calligyra*, *Sp. phagedenis* et *Sp. genitalis*).

Il utilise en principe deux milieux différents : l'un, milieu

liquide, est un milieu d'enrichissement, l'autre, milieu solide, est le milieu d'isolement et de culture. Le premier est constitué par du sérum de mammifère déposé sur un fragment de tissu stérile frais (rein ou testicule de lapin ou de mouton) ; le milieu solide est de la gélose-sérum, dans la proportion de trois parties de gélose pour une de sérum, recouvrant encore un morceau de tissu frais.

La semence choisie, est déposée d'abord dans le milieu liquide, au voisinage du fragment d'organe ; le milieu est recouvert d'huile de vaseline et porté à l'étuve à 37° pendant une dizaine de jours. Au bout de ce temps, on retire le tube de l'étuve et, avec une pipette capillaire, on prélève une petite quantité de la culture développée au fond du tube. Si le prélèvement se révèle satisfaisant à l'examen, on le transporte dans le milieu solide, en enfonçant soigneusement la pipette dans l'axe du tube ; la semence est repoussée doucement au voisinage du fragment d'organe, en prenant soin de ne pas fendre la gélose par des bulles d'air ; le milieu est ensuite recouvert d'huile de vaseline et porté à 37°, pendant dix jours à deux semaines. Après ce laps de temps, une colonie nuageuse apparaît, s'étendant autour du canal de la piqûre qui est maintenant remplie par une masse blanchâtre de colonies bactériennes. Quand la taille de la colonie est devenue assez importante pour permettre d'y puiser, le tube est coupé et la colonne de gélose doucement rompue. Avec une pipette on prélève la culture, on l'examine à l'ultra-microscope et le produit doit montrer d'innombrables spirochètes. Il ne reste qu'à effectuer un nombre suffisant de repiquages pour obtenir la culture pure.

Tel est l'essentiel de la technique de Noguchi et ce procédé qui cependant se montra si fructueux entre les mains de son auteur ne fut pas repris, ou plutôt, doit-on penser, repris par d'autres auteurs les rebuta, de telle sorte que très rares sont les bactériologistes qui ont confirmé les résultats pourtant importants obtenus par le savant japonais.

Shmamine, 1912, réussit cependant la culture et l'isolement de *Sp. microdentium*. D. Smith, récemment, obtint encore des cultures de *Sp. microdentium* et de *Sp. macrodentium*, mais cet auteur fut obligé de modifier la technique de Noguchi en effectuant des passages préalables sur le cobaye pour éliminer une partie des bactéries gazogènes qui disloquent le milieu gélosé. Le même auteur pense avoir cultivé, en anaérobiose, sur gélose au sang, *Sp. buccalis*, mais un doute subsiste, certains éléments présentant une grande ressemblance avec le bacille fusiforme mobile.



## TECHNIQUE DE KRITCHEWSKY ET SÉGUIN.

En France, B. Kritchewsky et Séguin obtinrent des résultats plus importants. Poussant plus loin la vérification des travaux de Noguchi, ils constatèrent les faits suivants : telle quelle, la technique de cet auteur ne leur parut qu'exceptionnellement couronnée de succès ; dans les milieux indiqués, la pullulation des anaérobies putrides ou gazogènes rend le plus souvent impossible toute séparation des spirochètes. Après diverses tentatives, ils utilisèrent comme milieu le sérum hémicoagulé de cheval ou de bœuf (milieu de Schereschewsky additionné d'un fragment de rein frais de lapin (milieu S1). Ce milieu se prépare de la façon suivante :

Des tubes de 11 millimètres de diamètre et de 19 millimètres de haut sont bouchés au coton et stérilisés au four à flamber. On introduit ensuite aseptiquement, dans chaque tube, un morceau de rein, puis on distribue, à la boule, du sérum stérile de cheval ou de bœuf, de façon à remplir les 2/3 du tube. La coagulation s'effectue au bain-marie entre 60° et 65° ; elle doit être faite lentement et arrêtée dès que le sérum est gélifié, tremblotant. Le milieu doit rester entièrement transparent.

Ce milieu est ensemencé avec une pipette ouverte, chargée d'une trace du matériel prélevé. Lorsque des spirochètes s'y développent, leur croissance se manifeste par l'apparition d'un halo, trois ou quatre jours après l'ensemencement, au voisinage du fragment de rein ou dans la partie la plus profonde de la piqûre. Le tube est alors coupé à ce niveau et après contrôle microscopique, un premier repiquage est effectué. Après plusieurs passages, la culture pure peut être obtenue.

Une bonne modification de cette technique consiste à utiliser, dans les cas difficiles, ce même milieu additionné de II gouttes de vert malachite (sol. à 2 p. 100). L'antiseptique est ajouté au sérum avant coagulation. Dans ce milieu S2, le développement des cocci gazogènes est retardé, sans que le départ des spirochètes soit entravé. (Rappelons à ce propos que Proca, Danila et Stroe ont autrefois préconisé l'emploi du violet de gentiane pour favoriser la séparation de divers spirochètes ; mais leurs tentatives n'aboutirent pas à l'obtention des cultures pures).

Par cette technique, Kritchewsky et Séguin ont isolé *Sp. microdentium*, *Sp. macrodentium*, *Sp. acuta* (*Sp. skoliodonta*)

dont la séparation d'avec le bacille fusiforme ne put d'ailleurs être complètement réalisée dans ce milieu. Ultérieurement, Séguin a pu isoler *Sp. calligyra*, *Sp. refringens*, *Sp. comandoni* et *Sp. ambigua*.

Il n'est pas douteux que cette technique constitue à la fois un perfectionnement de celle de Noguchi et une confirmation importante des travaux de l'auteur japonais.

Mais ces résultats furent encore dépassés par Vinzent et Daufresne qui réussirent à mettre au point un milieu solide électif dans lequel ils isolèrent non seulement toutes les espèces précédemment décrites, mais encore plusieurs spirochètes nouveaux particulièrement délicats, comme *Sp. skolidonta*, *Sp. trimerodonta*, *Sp. orogyrata*, etc. Aussi, croyons-nous indispensable de nous étendre avec quelques détails sur ce dernier procédé de culture qui constitue actuellement la meilleure technique dont nous disposons.

#### TECHNIQUE DE VINZENT ET DAUFRESNE.

Le milieu utilisé par Vinzent et Daufresne (milieu MS) est formé par de la gélose nutritive au sérum, dans la proportion de trois parties de gélose pour une de sérum.

La composition de la gélose répond à la formule suivante :

Macération de viande (300 grammes pour 1 litre d'eau) . . .	1.000
NaCl. . . . .	5
Gélose . . . . .	15

Le milieu est ajusté au pH 8.

Les tubes utilisés correspondent au calibre de ceux de Séguin, cette dimension convient bien au procédé de séparation sans nécessiter une trop grande quantité de milieu. Les tubes fermés au coton sont stérilisés au four à flamber et chacun reçoit un fragment de rein de mouton prélevé aseptiquement. Le fragment suffisamment petit pour pouvoir être introduit dans le tube est d'un volume assez important néanmoins. Cela étant réalisé, on fait fondre la gélose ; lorsqu'elle est liquéfiée, on la maintient au bain-marie à 50° environ et dans le même récipient on dépose les flacons contenant le sérum de mouton (c'est ce sérum qui a paru fournir les

milieux les plus limpides). Quand l'équilibre de température est atteint on effectue le mélange dans les proportions requises et l'ensemble est réparti dans les tubes, sur les fragments de rein, sur une hauteur de 10 centimètres environ. On laisse faire prise et le milieu peut être employé aussitôt, mais il reste utilisable pendant un mois au moins.

Marc Daufresne et Vinzent ont recherché les caracté-

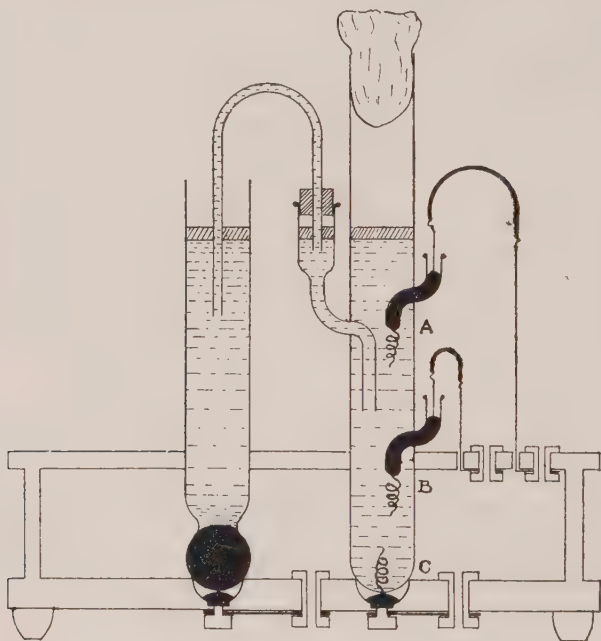


FIG. 1. — Schéma de l'appareil utilisé pour mesurer le potentiel d'un milieu de culture solide à différents niveaux.

A, électrode latérale supérieure; B, électrode latérale inférieure; C, électrode du fond.

ristiques potentiométriques de ce milieu. Avec des tubes préparés spécialement à cet effet, contenant des électrodes soudées à des niveaux déterminés (voir schéma), et au cours d'expériences répétées, ils ont obtenu les courbes représentées dans le graphique n° 1 et qui indiquent de façon précise la gamme de eH que constitue le milieu depuis la date de sa préparation jusqu'au vingt-sixième jour.

Comme on connaît mal encore le rôle du sérum et du frag-

ment d'organe contenus dans le milieu, les mêmes auteurs ont effectué des mesures inscrites dans le graphique n° 2. Elles montrent (courbe 1) le potentiel d'oxydo-réduction de la gélose nutritive seule ; la modification apportée par l'addition de glucose évolué (courbe 2) et l'abaissement du eH plus important provoqué déjà par le sérum seul et surtout par le sérum et le fragment d'organe (courbes 3 et 4).

Le milieu MS convient aussi bien pour la conservation des souches que pour l'isolement des spirochètes.

a) TECHNIQUES DE SÉPARATION DES SPIROCHÈTES DES BACTÉRIES ASSOCIÉES. — Les spirochètes commensaux n'existent jamais à l'état pur dans une lésion quelconque et on ne les trouve pas davantage à l'état de pureté sur une muqueuse saine. Ils sont toujours accompagnés par une flore microbienne plus ou moins dense et variée, incomplètement connue encore d'ailleurs. Cette flore qui a été étudiée en France surtout par Veillon et ses élèves (Rist, Guillemot, Hallé, Zuber, Cottet, S. Toledo) et par Vincent, est essentiellement anaérobie. Formée par des bacilles et des cocci appartenant à des espèces nombreuses, parfois même par des Champignons ou des Protozoaires (Trichomonas), elle contient des bactéries mobiles qui constituent l'obstacle le plus difficile à vaincre pour obtenir la culture pure des spirochètes. C'est qu'en effet la séparation des micro-organismes hélicoïdaux est basée avant tout sur leur grande mobilité et la propriété qu'ils possèdent de s'infiltrer dans le milieu solide et de l'envahir loin de l'endroit où on les a déposés.

La semence est prélevée dans une pipette Pasteur ouverte. pipette correctement faite, c'est-à-dire possédant une effilure bien centrée, bien droite et cylindrique sur sa plus grande longueur. L'effilure ne doit pas être trop grosse, pour ne pas fendre la gélose au cours de l'opération d'ensemencement, pas trop fine non plus, car lorsque l'on effectuera le premier repiquage et les suivants, il faut que la gélose aspirée puisse être facilement repoussée dans le milieu neuf. La semence, prélevée en petite quantité, doit être déposée au voisinage du fragment d'organe, sans l'atteindre cependant, car il existe une petite lame liquide qui entoure le fragment et qui risque-



rait d'être envahie par les bactéries. L'ensemencement doit toujours être fait sur plusieurs tubes à la fois. Lorsqu'il est terminé, les milieux sont recouverts d'un peu d'huile de vaseline stérile et portés à l'étuve à 37°. (L'addition d'huile de vaseline n'a pas pour but, évidemment, de réaliser l'anaérobiose ; on sait que l'oxygène de l'air se dissout à peu près en même quantité dans l'huile et dans l'eau, mais l'huile évite la dessiccation de milieux qui peuvent séjourner assez longtemps à l'étuve).

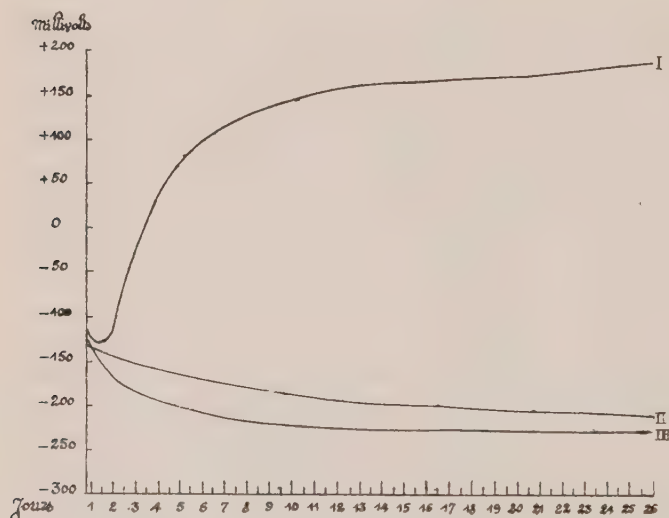


FIG. 2. — I, potentiel au niveau de l'électrode A; II, potentiel au niveau de l'électrode B; III, potentiel au niveau de l'électrode C.

Les tubes sont ensuite examinés tous les jours et même plusieurs fois par jour. Dès le lendemain de l'ensemencement, le trait de piqûre se garnit de colonies bactériennes, il arrive que des bactéries donnent des gaz qui fragmentent le milieu et parfois la colonne de gélose se trouve séparée du fragment d'organe et repoussée par les gaz : par une petite secousse on rétablit le contact. Dans les conditions les plus favorables et pour les espèces qui croissent rapidement, vers le deuxième ou troisième jour, on voit apparaître, près du tissu, un halo qui s'étend assez rapidement : on le voit nettement s'accroître du matin au soir. Lorsque ce halo se maintient au voisinage

du fragment on peut penser qu'il s'agit d'une colonie de spirochètes ; si l'on avait affaire à une bactérie mobile, celle-ci envahirait le milieu sur une plus grande hauteur.

Le tube choisi est retiré de l'étuve ; à l'aide d'un trait de lime, suivi de l'application d'une gouttelette de verre fondu, on le sectionne, un peu au-dessus de la zone trouble correspondant à la colonie supposée ; on rompt la gélose en même temps. Puis, avec une pipette stérile, on prélève un petit cylindre de gélose en pleine zone nuageuse, en s'éloignant le plus possible du trait de piqure d'ensemencement, mais en



FIG. 3.

évitant aussi la lame liquide qui existe entre la colonne de gélose et le tube de verre. Il faut aussi éviter encore, autant qu'on le peut, de traverser les failles qui auraient pu être produites par les gaz et qui contiennent des bactéries.

Du cylindre de gélose prélevé on dépose une petite quantité sur une lame de verre flambée — la lame de verre est stérilisée afin de ne pas souiller l'extrémité de la pipette qui servira peut-être au premier repiquage —. Le petit fragment de gélose écrasé entre lame et lamelle est soumis à l'examen à l'ultra-microscope et si tout à été réussi, on constate le développement d'une quantité considérable de spirochètes. Les

spirochètes peuvent être purs dès ce moment, mais le plus souvent ils sont encore mêlés à des bactéries plus ou moins nombreuses dont il faut les séparer. De toute façon, on effectue le premier repiquage. (Il est prudent d'ensemencer encore plusieurs tubes). La séparation est en général réalisée vers le troisième ou quatrième repiquage, mais cela est éminemment variable.

Il arrive que l'on se trouve en présence de bactéries très mobiles, vibrions le plus souvent, qui envahissent le milieu plus rapidement que les spirochètes. On peut freiner le développement de ces bactéries en ajoutant au milieu, au moment de sa préparation, comme le fait Séguin, I ou II gouttes par tube d'une solution de vert de malachite à 2 p. 100. On peut encore, comme le conseillait Noguchi abandonner les cultures impures à l'étuve pendant un mois ; il arrive qu'au bout de ce délai, les bactéries soient mortes alors que les spirochètes sont restés vivants. Mais souvent aussi, il est nécessaire de pratiquer un nouveau prélèvement et de reprendre toutes les opérations.

b) SÉPARATION DES SPIROCHÈTES APPARTENANT A DES ESPÈCES DIFFÉRENTES. — Tels sont les procédés qui permettent de séparer les spirochètes des bactéries ; on conçoit que si la semence ne contient qu'une seule espèce de spirochètes, celle-ci puisse être obtenue en culture pure assez facilement. Mais lorsque la semence contient plusieurs espèces, ce qui est le cas le plus fréquent, comment doit-on opérer pour les séparer les unes des autres ? Selon l'espèce recherchée, on utilisera des procédés différents :

1° L'espèce la plus vivace, celle qui se multiplie le plus rapidement dans le milieu offert, sera isolée facilement en effectuant des repiquages rapprochés, toutes les quarante-huit heures par exemple. Le prélèvement destiné au repiquage devra porter sur la partie la plus excentrique de la colonie.

2° L'espèce qui peut pousser loin du fragment d'organe sera isolée en procédant à des prélèvements des parties les plus hautes de la culture.

3° Les espèces délicates, celles qui ne se multiplient qu'au voisinage du fragment d'organe seront recherchées à ce niveau.

Mais elles se trouvent inévitablement mélangées aux espèces vivaces dont les représentants sont encore plus abondants et dont il faut les séparer. Plusieurs moyens nous sont offerts : ou bien modifier le milieu, ou bien procéder à des séparations par dilutions successives comme dans la technique de Veillon.

Dans le premier cas, on modifie le milieu par addition de substances variées, par exemple du phosphate bisodique ; un tel milieu nous a permis à plusieurs reprises de séparer *Sp. macrodentium*. On peut aussi employer un milieu totalement différent du milieu courant : l'extrait d'ascite (1) gélosé nous a permis de séparer *Sp. trimerodonta* et *Sp. orogyrata*.

Dans le deuxième cas, la culture mixte est diluée dans du sérum et, avec une faible quantité de cette émulsion, on sème successivement 10 à 15 tubes dont le contenu est maintenu liquide au bain-marie à 42° environ. Mais il ne faut pas oublier que les espèces recherchées ne pouvant se multiplier qu'au voisinage du tissu, les tubes ne doivent contenir qu'une petite quantité de milieu (3 à 4 cent. cubes). Les tubesensemencés sont refroidis rapidement et la hauteur du milieu est ramenée à son niveau habituel par addition, dans un deuxième temps, de milieu liquéfié nonensemencé. Les tubes, ainsi complétés, sont portés à l'étuve et observés régulièrement ; les colonies qui apparaissent doivent être examinées aussitôt et, dès que le type morphologique recherché est rencontré, on procède au repiquage.

#### CONSERVATION DES SOUCHES.

Par les divers procédés que nous venons d'indiquer, nous avons isolé un nombre important de souches appartenant à des espèces variées. Nous les conservons toutes dans le milieu MS et nous n'en avons perdu aucune jusqu'à présent (certaines souches ont été isolées il y a déjà plusieurs années). Les repiquages sont faits une fois par mois. La conservation ainsi facilitée nous a permis de comparer nos souches afin d'en établir une classification rationnelle par l'étude des caractères morphologiques, biologiques, sérologiques ; en un mot, par des

(1) Nous donnons ce nom au liquide obtenu après filtration d'ascite coagulé par la chaleur.



procédés analogues à ceux que la Bactériologie emploie couramment.

*Sp. microdentium*, Noguchi, 1912.

Noguchi a décrit, en 1912, sous le nom de *Treponema microdentium*, un spirochète de la flore buccale dont il a réussi le premier à obtenir une culture pure. Ce microorganisme, isolé depuis par Schmammine, Kritchewsky et Séguin, Smith, Vincent et Daufresne, est, de tous les spirochètes buccaux, celui qui a été le plus souvent cultivé et dont l'isolement est, relativement, le moins difficile. Depuis le début de nos recherches, il nous en est passé entre les mains une vingtaine de souches et nous avons ainsi pu nous convaincre de l'unité de cette espèce et de sa grande fixité. Nous avons cru utile, malgré la haute qualité de la description donnée par Noguchi, de détailler à nouveau l'ensemble des caractères du *Sp. microdentium*. Nous espérons faciliter ainsi, par l'emploi d'une méthode comparative aussi rigoureusement précisée que possible, la définition des nouvelles espèces de spirochètes que nous avons eu la bonne fortune d'isoler.

HABITAT.

Commun dans le dartre dentaire, on le retrouve avec fréquence dans la flore pathologique des sillons gingivaux, gingivites, stomatites, pyorrhées, et dans celle du noma. Dans certains cas, l'examen direct permet de présumer d'emblée son existence, dans d'autres, il ne se révèle qu'aux ensemencements, après plusieurs repiquages.

On le retrouve également, avec une grande fréquence, dans les lésions ulcéreuses de l'amygdale, qu'il s'agisse de l'angine de Vincent typique (où H. Vincent lui-même a admis sa présence) ou des lésions d'amygdalite chronique.

Nous l'avons décelé régulièrement dans la flore des infections fétides des bronches et des poumons et, spécialement, dans la gangrène pulmonaire.

Enfin, tout récemment, nous avons isolé *Sp. microdentium* dans un cas mortel d'appendicite gangréneuse.

Voici, à titre de document, la liste des souches de *Sp. microdentium* qui nous sont passées entre les mains depuis 1920, ainsi que leur origine :

Cr... . . . .	Stomatite.	RN <sup>3</sup> ... . . . .	Radionécrose.
Mad... . . . .	Gingivite.	B <sup>1</sup> ... . . . .	Stomatite.
Bo... . . . .	Gingivite.	B <sup>2</sup> ... . . . .	Stomatite.
Ro... . . . .	Amygdalite chronique.	Nat... . . . .	Pyorrhée.
Ler... . . . .	Pyorrhée.	Nan... . . . .	Pyorrhée.
Barj... . . . .	Pyorrhée.	Bas... . . . .	Pyorrhée.
Guir... . . . .	Gingivite.	Pl <sup>4</sup> ... . . . .	Pleurésie putride.
Fauch... . . . .	Pyorrhée.	Ap... . . . .	Appendicite gangréneuse.
GP <sup>2</sup> ... . . . .	Gangrène pulmonaire.	Boisv... . . . .	Dent de sagesse infectée.
RN <sup>4</sup> ... . . . .	Radionécrose.		

### MORPHOLOGIE.

Dans des conditions précises de milieu, d'âge et de pH, *Sp. microdentium* possède des caractères morphologiques invariables et qui permettent de le définir avec une grande vraisemblance. Notons cependant, d'ores et déjà, que *Tr. mucosum* Noguchi et *Sp. ambigua* (nov. sp.) ne peuvent guère être différenciés de *Sp. microdentium* que d'après des caractères biologiques et culturaux.

1° MORPHOLOGIE EN CULTURE JEUNE. — La morphologie de *Sp. microdentium* doit être définie en culture de vingt-quatre heures à trois jours, en bouillon-sérum-rein (pH : 7,6-7,8) et provenant du repiquage d'une culture jeune (de moins de huit jours). Dans ces conditions, le microorganisme reste toujours comparable, et des souches suivies pendant plus de dix ans (souche Mad., par exemple) n'ont présenté aucune variation morphologique notable, bien qu'elles aient subi en deux lustres plusieurs centaines de repiquages successifs.

L'aspect de la culture, aussi bien à l'examen au fond noir qu'après coloration, est des plus homogènes.

A. *Examen au fond noir.* — Au fond noir, les microorganismes sont sensiblement tous de même longueur. Les formes les plus communes ont de 4 à 7  $\mu$ , ce qui correspond en moyenne à des éléments de 6-12 tours de spire.

Ils sont activement mobiles, animés d'un mouvement de rotation suivant le grand axe et d'un faible mouvement de

flexion. Ce qui caractérise *Sp. microdentium*, c'est l'apparence rigide que conservent les éléments, même dans leur plus grande activité.

Les spirochètes sont isolés, en voie de division transversale simple ou multiple, ou groupés en amas caractéristiques, véritables colonies à centre opaque et à structure rayonnée, ayant

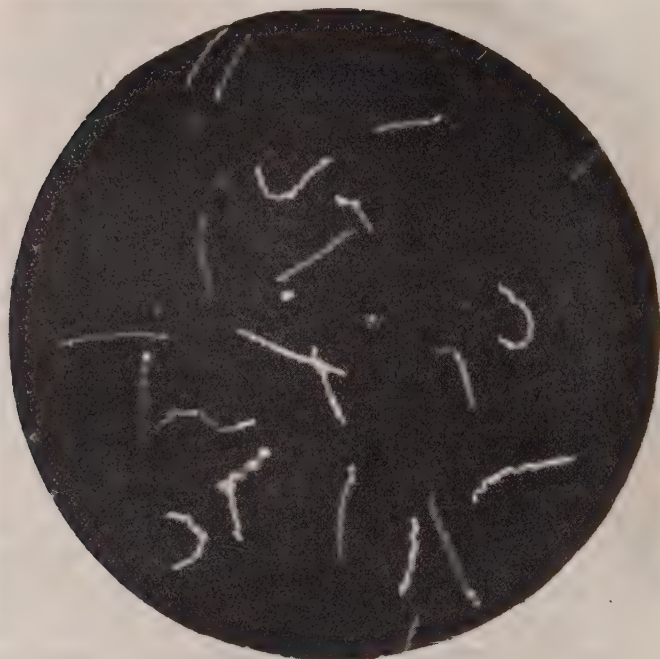


FIG. 4. — *Sp. microdentium*. Souche B<sup>3</sup>... Origine : stomatite ; culture jeune en bouillon-sérum-rein. Photomicrographie de culture vivante (ultra-microscop. D<sup>r</sup> Comandon). Grossiss. : 4.800.

l'aspect de petits astéroïdes. Ces amas en étoile, que l'on rencontre chez plusieurs espèces de spirochètes buccaux sont particulièrement précoces, abondants et remarquables dans les cultures de *microdentium*.

Les tours de spire sont étroits (inférieurs à 1  $\mu$ ), bien marqués, réguliers, peu déformables et légèrement anguleux.

A côté de cette forme typique, l'on rencontre souvent aussi, quoique en moindre abondance, des éléments de même lon-

gueur, à tours de spire plus larges et plus plats, plus déformables et aux extrémités plus effilées. Nous avons cru longtemps que ces éléments appartenaient à une autre espèce de spirochète buccal, mélangée au *Sp. microdentium*. Des isoléments pratiqués dans les conditions les plus rigoureuses nous ont convaincus de l'impossibilité de sélectionner l'une ou

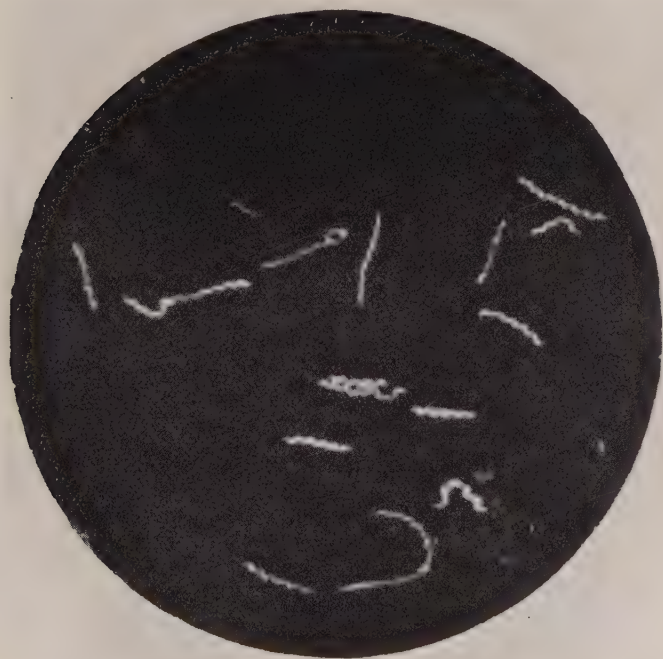


FIG. 5. — *Sp. microdentium*. Souche Ap... Origine : appendicite gangréneuse culture jeune en bouillon-sérum-rein. Photomicrographie de culture vivante (ultramicroscope, D<sup>r</sup> Comandon). Grossiss. : 1.800.

l'autre des deux formes (forme à tours de spire serrés, forme à tours de spire lâches et aplatis). Enfin, des divisions transversales simples, suivies au fond noir, nous ont montré, à plusieurs reprises, un élément se fragmentant en deux autres, dont l'un appartenait au type serré, l'autre au type lâche.

Il n'est donc pas douteux que ces deux formes appartiennent l'une et l'autre à *Sp. microdentium*, dont elles constituent,



dans les cultures jeunes, les deux limites entre lesquelles évolue le type morphologique fondamental.

B. *Frottis colorés*. — *Sp. microdentium* peut se colorer par le Giemsa et par toutes les techniques usitées pour la coloration des cils. Nous le décrirons d'après notre technique de coloration personnelle (Fontana-Tribondeau modifié).

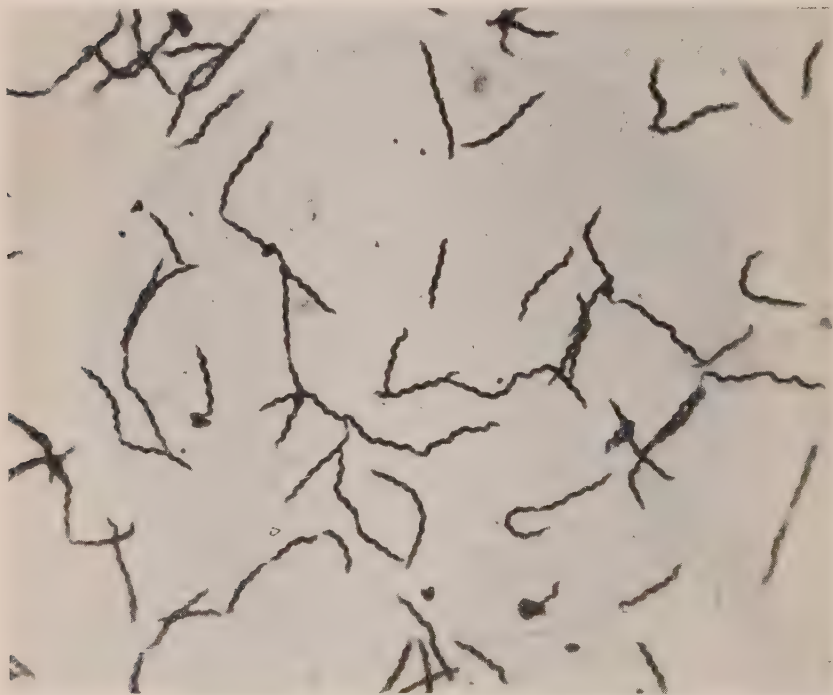


FIG. 6. — *Sp. microdentium*. Souche Mad..., gingivite chronique; culture jeune en bouillon-sérum-rein. Coloration Fontana-Tribondeau modifié (Photo Jeantet). Grossiss. : 4.800.

Remarquer les nombreuses divisions transversales simples et multiples.

Ainsi imprégnés, les spirochètes apparaissent en noir sur un fond transparent. Les dimensions sont sensiblement les mêmes qu'à l'état frais, en tenant compte cependant d'un léger épaissement dû à l'imprégnation. Noter les tours de spire légèrement anguleux, les formes en division simple et multiple, réunies entre elles par un filament terminal ondulé grisâtre. Parmi les formes isolées, certaines possèdent un fila-

ment terminal ondulé à une extrémité ; d'autres, plus rares, en posèdent un aux deux bouts. Ces filaments présentent 2, 3, 4 et jusqu'à 10 tours de spire.

Certains éléments sont munis d'un filament latéral, également ondulé.

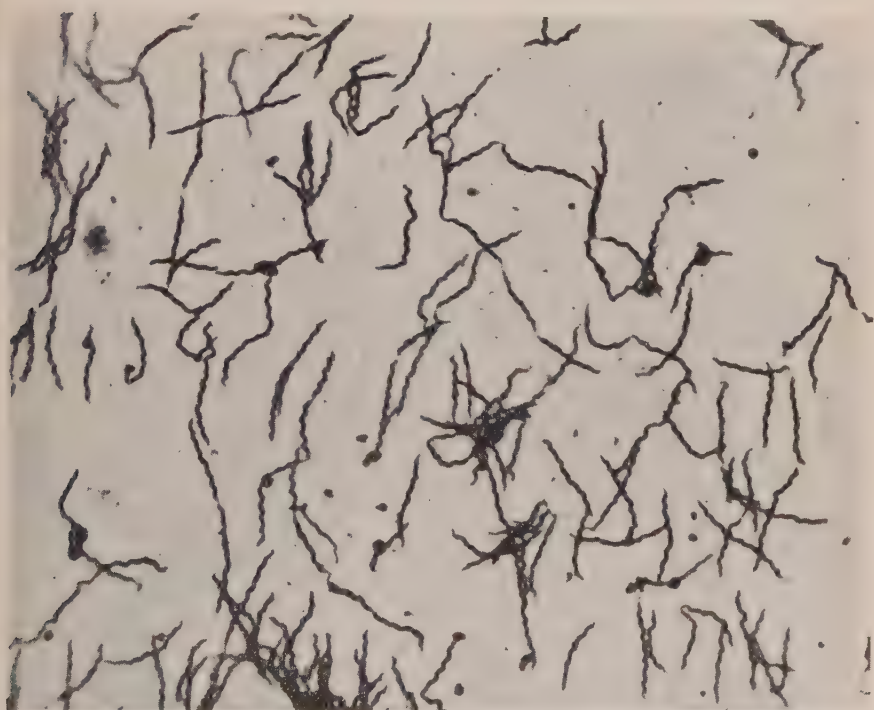


FIG. 7. — *Sp. microdentium*. Souche Mad..., gingivite chronique; culture jeune en bouillon-sérum-rein. Coloration Fontana-Tribondeau modifié (Photo Jeantet, Grossiss. : 1.800).

Remarquer les nombreuses formes de division et les amas en étoile.

2° MORPHOLOGIE EN CULTURE AGÉE. — Autant l'aspect d'une culture jeune (de vingt-quatre heures à trois jours) en bouillon-sérum-rein est homogène et caractéristique, autant celui d'une culture âgée (de trois à six semaines), dans le même milieu est hétérogène et difficile à décrire.

Au fond noir, la mobilité très atténuée n'apparaît plus que chez quelques éléments, d'ordinaire allongés, et qui sont ani-

més de mouvements périodiques, saccadés. Un polymorphisme très accentué frappe l'observateur : formes de taille très variable, dont certaines remarquables par leurs tours de spire détendus et leur apparence strepto-bacillaire, éléments épaissis, formes enroulées et granuleuses, tel est l'aspect général de la culture âgée à l'examen direct.

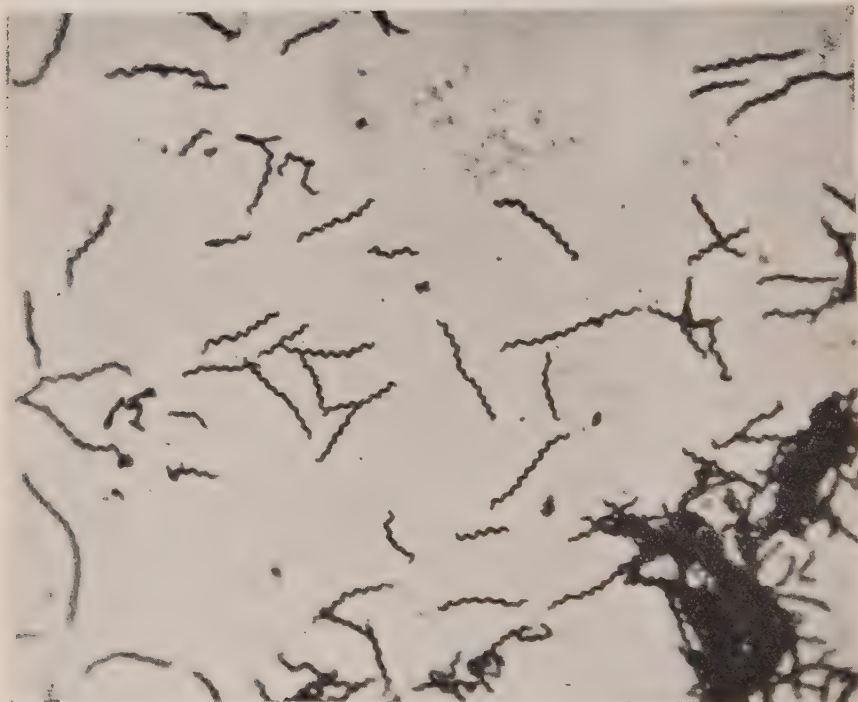


FIG. 8. — *Sp. microdentium*. Souche GP<sup>2</sup>... Origine : gangrène pulmonaire; culture jeune en bouillon-sérum-rein. Coloration Fontana-Tribondeau modifié (Photo Jeantet). Grossiss. : 4.800.

Après coloration, le polymorphisme est plus frappant encore. Trois catégories de formes d'involution sont particulièrement intéressantes.

Des formes atypiques à tours de spire bien marqués, mais nettement anormaux : ceux-ci sont souvent épaissis, vari-queux, comme empâtés. Les spirochètes sont de toutes tailles, depuis des éléments très courts, à 1-2 tours de spire, jusqu'à

des unités géantes présentant 20, 30 tours de spire et même davantage.

Des formes détendues à spirales aplaties, souvent en voie de division transversale multiple. Certains éléments sont bien colorés, parfois même plus imprégnés que les spirochètes normaux ; d'autres sont, au contraire, plus pâles, d'une teinte uniforme grise ; d'autres, enfin, se présentent comme des chapelets de granulations argentophiles, unies par un protoplasme grisâtre.

Enfin, des formes enroulées (boucles, anneaux, couronnes), formant tantôt des cercles complets, tantôt des anneaux prolongés par une queue plus ou moins spiralée et plus ou moins imprégnée (formes en têtard). Ces anneaux, de diamètre et de concentration très variables, sont souvent groupés en amas où dominent des éléments concentrés, arrondis, peu chromatiques, pourvus d'un point central argentophile (corps sphéroïdes).

Pour achever ce tableau, nous devons signaler la présence, dans les cultures âgées, de microspirochètes et de granules pourvus d'un filament ondulé (ultra ou infravirus, granules spirochétogènes, Manouelian). Difficiles à mettre en évidence dans les vieilles cultures de *Sp. microdentium* en bouillon-sérum-rein (à cause de l'abondant précipité formé par les albumines en voie de protéolyse, lesquelles nuisent à la pureté des imprégnations), ces éléments se colorent sans grosses difficultés, lorsque l'on part de cultures vieilles (vingt-et-un jours), en bouillon-liquide hydatique-rein. Les granules (aux plus forts grossissements) sont à la limite extrême de la visibilité et prolongés par un filament ondulé de la plus exquise délicatesse.

A ce propos, il y a lieu de faire remarquer que l'apparence des cultures âgées dépend autant de la nature du milieu que de l'âge de la culture. En bouillon-ascite-rein, en sérum hémicoagulé-rein, les cultures vieillissent moins vite et sont, par conséquent, moins vite involuées qu'en bouillon-sérum-rein. L'étude des propriétés biochimiques et de la vitalité du *microdentium* en divers milieux nous rendront compte de ce phénomène.



## ISOLEMENT.

Facile à obtenir en culture impure dans des milieux additionnés de sérum (Mûlhens, etc.), le *Sp. microdentium* est le moins difficile à isoler des spirochètes buccaux.

Nous avons déjà indiqué plus haut les lignes de conduite générale de la technique de culture ainsi que la composition des milieux d'isolement. Nous n'ajouterons ici que quelques détails spéciaux au *Sp. microdentium*.

Rappelons que pour réussir la séparation de ce germe, comme d'ailleurs celles des autres spirochètes buccaux, il y a lieu d'ensemencer directement les sécrétions par piqure profonde à la pipette, dans un milieu d'enrichissement à base de sérum-rein.

Nous réussissons couramment l'isolement du *Sp. microdentium* en utilisant l'un ou l'autre des milieux suivants :

Gélose-sérum-rein (formule MS).

Sérum-hémicoagulé-rein (formule S<sup>1</sup>).

Lorsque les spirochètes apparaissent dans le halo qui entoure la strie d'ensemencement, c'est-à-dire, d'habitude, entre le deuxième et le cinquième jour, on procède à un repiquage et à un essai de séparation.

On peut essayer également la séparation en ensemençant suivant la technique de Veillon, à la pipette et dans la zone anaérobie profonde, une série de 8-10 tubes de gélose ascite (sans rein). Pour isoler le *Sp. microdentium*, l'addition de rein frais dans les premiers tubes de culture est généralement inutile, surtout si la bactérie favorisante associée est le bacille fusiforme. Dans ces conditions, on peut obtenir en trois à cinq jours d'étuve, dès le second repiquage, des colonies séparées de *Sp. microdentium*. Celles-ci apparaissent dans la zone anaérobie profonde au voisinage des colonies du microbe favorisant, dont l'apparition a précédé de vingt-quatre à quarante-huit heures celle des colonies de spirochètes. Les colonies les mieux séparées de *Sp. microdentium* sont alors prélevées à la pipette et repiquées en gélose-sérum-rein.

Mais, très souvent, l'abondance de cocci anaérobies, soit saccharolytiques (type *Veillonella*), soit protéolytiques (type *M. fætidus*), contrarient la séparation des spirochètes. Dans

ces circonstances difficiles, il y a lieu de recourir à un milieu d'enrichissement spécial, additionné d'un antiseptique. Les meilleurs résultats, en ce qui concerne *Sp. microdentium*, ont été obtenus avec le sérum hémicoagulé-rein au vert de malachite (milieu S<sup>2</sup>). Dans ce milieu, les cocci anaérobies se développent avec un à deux jours de retard sur les spirochètes. Aussi, si l'on a soin de pratiquer un repiquage au moment opportun, c'est-à-dire dès l'apparition des organismes spiralés (parfois dès le deuxième, habituellement au troisième jour), on peut réussir des isollements dans des cas fort difficiles (sécrétions provenant de pyorrhée chronique par exemple).

Il est parfois avantageux, pour obtenir sans peine *Sp. microdentium*, à l'exclusion d'autres espèces de spirochètes, de laisser vieillir à l'étuve les tubes ensemencés. Après plusieurs semaines d'étuve (surtout en sérum-hémicoagulé-rein), on rencontre souvent, dans le sérum liquéfié par digestion, une abondance de spirochètes avec prédominance de *Sp. microdentium*, à l'exclusion d'autres espèces de spirochètes, de ce matériel donnera, si elle réussit, ce microorganisme.

#### CARACTÈRES CULTURAUX.

Une fois isolé, *Sp. microdentium* peut être repiqué dans une série de milieux à base de sérum (ou succédanés) que, pour la commodité de l'exposition, nous grouperons en quatre catégories :

- 1° Milieux au rein frais.
- 2° Milieux au rein autoclavé.
- 3° Milieux sans rein.
- 4° Milieux partiellement digérés.

Dans tous ces milieux, *Sp. microdentium* se comporte comme un anaérobie strict, thermophile, avec développement optimum vers 33°.

#### 1° MILIEUX AU REIN FRAIS.

Ces milieux, milieux classiques de Noguchi, restent les plus recommandables pour l'isolement et la culture rapide et abondante de *Sp. microdentium*.

Il y a lieu de distinguer les caractères culturaux en milieux liquides et en milieux solides.

A. MILIEUX LIQUIDES AU REIN FRAIS. — Le bouillon au rein frais de lapin (2) (pH 7,6-7,8) doit être additionné d'un liquide organique stérile : sérum de cheval, de mouton, de bœuf, de lapin, liquide d'ascite, liquide hydatique, albumine d'œuf. Suivant la nature du liquide organique ajouté, *Sp. microdentium* se développe avec des caractères particuliers.

a) *Bouillon rein sérum de cheval*. — En bouillon rein sérum de cheval, la culture est particulièrement précoce et abondante. Lorsqu'on repique une culture jeune (de moins de huit jours), dont les éléments sont en pleine division transversale active, la culture fille part d'emblée et souvent, après vingt-quatre heures d'étuve, toujours après quarante-huit heures, apparaît le trouble typique qui annonce le succès du réensemencement.

Tout au fond du tube, au voisinage du rein, on remarque un trouble léger, mais net, au-dessus duquel s'étagent des anneaux moirés, concentriques, de plus en plus clairs, absolument caractéristiques.

A mesure que la culture vieillit, la hauteur du trouble inférieur augmente et les anneaux moirés s'élèvent. La zone claire de bouillon comprise entre la couche inférieure d'huile de vaseline et l'anneau moiré supérieur tend à se réduire et, finalement un trouble uniforme envahit le milieu en sa totalité.

A ce stade, qui correspond à une culture d'une huitaine de jours, on assiste à la précipitation massive du sérum de cheval en un coagulum compact. Celui-ci englobe le fragment de rein qui prend peu à peu une teinte gris-noirâtre.

Dans les jours qui suivent, le sérum précipité est lentement digéré par les spirochètes. Le coagulum fonce de plus en plus et le bouillon devient jaune sombre.

Après quatre à six semaines d'étuve, la digestion du sérum est complète. On ne voit plus au fond du tube qu'un magma gris noirâtre, contenant souvent des masses de cristaux d'acides aminés.

(2) Ou indifféremment de cobaye, mouton, veau, etc.

A noter l'odeur fétide, *sui generis*, de la culture qui, marquée dès l'origine, ne fait que s'accroître avec le vieillissement.

b) *Bouillon rein sérum de mouton*. — Dans ce milieu, les caractères de culture sont sensiblement identiques à ceux que nous venons de décrire. La culture est cependant un peu moins abondante qu'en sérum de cheval et le caillot d'albumine coagulé moins volumineux.

c) *Bouillon rein sérum de bœuf*. — Mêmes caractères. Le noircissement du caillot est plus marqué et le liquide de digestion a une teinte plus foncée.

d) *Bouillon rein sérum de lapin*. — Le trouble initial est moins accusé que dans les milieux précédents. Les anneaux moirés concentriques sont plus transparents, à peine visibles. La coagulation du milieu est peu prononcée. Le noircissement est nul.

e) *Bouillon rein liquide d'ascite*. — Mêmes caractères. Les anneaux moirés sont imperceptibles. Coagulation et noircissement nuls.

f) *Bouillon rein liquide hydatique*. — Milieu excellent où les spirochètes se développent rapidement en produisant un trouble léger sans anneaux moirés visibles. Pas de coagulation. Odeur fétide marquée.

g) *Bouillon rein albumine d'œuf*. — Départ de la culture un peu plus tardif. Le trouble débute après le troisième jour et s'accroît ensuite. L'albumine d'œuf coagulée est lentement digérée. Noircissement faible.

B. MILIEUX SOLIDES AU REIN FRAIS. — Nous avons étudié les caractères de *Sp. microdentium* dans les milieux solides suivants :

Gélose sérum (de diverses origines, ou succédanées).

Gélatine sérum.

Sérum hémicoagulé.

Gélose sérum rouge neutre.

Gélose sérum vert de malachite.

Gélose sérum sous-acétate de Pb.

Tous milieux additionnés de rein frais de lapin.

a) *Gélose sérum rein de lapin*. — La gélose au rein frais de



lapin (pH 7,8) peut être additionnée des liquides organiques divers énumérés au précédent paragraphe. Nous décrirons les colonies de *Sp. microdentium* en gélose sérum de cheval rein de lapin. Nous indiquerons, en cours d'exposé, les variations que subit la culture lorsqu'on substitue au sérum de cheval un autre liquide organique.

Si l'on ensemence la gélose rein en piqure profonde, on voit apparaître le long de la strie d'ensemencement et dans la zone d'anaérobiose, des colonies opaques qui, dès le troisième jour, s'entourent chacune d'un halo nettement visible. Les halos augmentent de jour en jour, deviennent confluent, jusqu'à occuper au bout d'une semaine environ toute la largeur et toute la hauteur du tube, sauf une zone très restreinte située au-dessous de la couche d'huile de vaseline.

Le milieu brunit légèrement à la longue, mais ne noircit pas. On observe, au contraire, un noircissement très prononcé du milieu lorsqu'on remplace, dans le milieu précédent, le rein de lapin par du rein de veau, ou encore si l'on ensemence en gélose sérum de bœuf rein de lapin. Dans le dernier cas, le noircissement est d'autant plus marqué que le sérum de bœuf est plus rouge (c'est-à-dire plus riche en débris d'hématies).

En gélose sérum de lapin rein ou en gélose ascite rein, les caractères de culture sont les mêmes qu'en gélose sérum de cheval rein. Les colonies sont cependant plus floues et plus transparentes et le milieu a moins tendance à foncer. De même en gélose albumine d'œuf rein. Le départ des colonies est cependant plus lent que dans les deux milieux précédents.

Si l'on ensemence une série de tubes de gélose sérum rein, encore liquides et tièdes, par agitation, suivant la technique de Veillon, on obtient des colonies séparées de *Sp. microdentium*. Celles-ci apparaissent d'abord au voisinage du rein, puis dans le tiers inférieur du tube et essaient graduellement vers la surface, tout en restant constamment dans la zone anaérobie. Ce sont des colonies arborescentes, ouatées, à centre opaque, entourées d'un halo clair. Cette technique est précieuse pour contrôler la pureté des souches isolées.

Enfin, nous avons obtenu des colonies en surface de *Sp. microdentium* en ensemencant des tubes de gélose ascite incli-

née, dans le fond desquels nous avons déposé un fragment stérile de rein de lapin. Après ensemencement, le tube (que l'on a choisi assez long) est étranglé au chalumeau et vidé, à la pompe, de l'air qu'il contient. On soude au milieu de l'étranglement et on porte à l'étuve. Après cinq ou six jours, on voit apparaître à la surface du milieu des colonies fines, plates, transparentes, à contours réguliers et ressemblant, avec plus de délicatesse encore, à celles du gonocoque. Le contrôle microscopique montre qu'il s'agit de colonies de *Sp. microdentium* en voie de multiplication active.

Dans tous ces tubes, quel que soit le mode d'ensemencement, il faut noter l'absence de bulles de gaz. Toutes les cultures dégagent une odeur infecte.

b) *Gélatine sérum rein de lapin*. — Les tubes ensemencés par piqûre sont portés à l'étuve à 33°. Le développement à 23° est en effet impossible. A 35°, la gélatine est liquéfiée et les spirochètes se développent comme en bouillon sérum rein. Le trouble au fond du tube est abondant, mais les anneaux moirés sont absents.

Au bout de six jours d'étuve, alors qu'un trouble très apparent dans le tiers inférieur du tube témoigne d'un développement massif des spirochètes, les tubes sont portés à la glacière. Le milieu reste liquide quel que soit le temps de séjour à 0°. La gélatine a donc été liquéfiée.

Le milieu a une forte odeur putride.

c) *Sérum hémicoagulé rein de lapin*. — Nous décrirons la culture en sérum de cheval hémicoagulé rein de lapin. Après ensemencement en piqûre, un halo caractéristique apparaît en deux ou trois jours le long de la strie et envahit progressivement tout le milieu, qui devient ainsi opaque. Celui-ci se fendille peu à peu et laisse exsuder un liquide jaunâtre, provenant de la digestion du sérum. Au bout de quelques semaines, le tube contient un coagulum noirâtre, rétracté, baignant dans un liquide jaune foncé, où nagent des boules blanches, grosses comme des têtes d'épingles, et constituées par des cristaux d'acides aminés.

Si, au lieu de sérum de cheval, on utilise du sérum de bœuf hémicoagulé, on observe les mêmes phénomènes, mais un noircissement plus précoce et plus marqué du milieu.

d) *Gélose sérum rein rouge neutre*. — Dès l'apparition des colonies, le rouge neutre devient fluorescent et l'on observe, le long de la strie d'ensemencement le développement d'un halo jaune canari qui entoure et souligne les colonies de *Sp. microdentium*.

e) *Gélose sérum vert de malachite*. — Même phénomène de réduction. Le colorant vire au jaune soufre au contact des colonies et le milieu prend peu à peu une teinte jaunâtre.

f) *Gélose sérum rein sous-acétate de plomb*. — Le milieu noircit rapidement le long de la strie d'ensemencement. Une teinte noire intense envahit peu à peu tout le tube.

## 2° MILIEUX AU REIN AUTOCLAVÉ.

Tous les milieux précédents peuvent être préparés, non avec du rein frais, mais avec des fragments du même organe stérilisés à l'autoclave. Ainsi que l'a déjà indiqué Noguchi, *Sp. microdentium* se développe rapidement dans les milieux au sérum, additionnés de rein stérilisé.

Mais cette technique n'est pas applicable à l'isolement. Elle ne convient que pour des souches déjà repiquées plusieurs fois dans les milieux au rein frais, et par conséquent déjà adaptées aux conditions de culture.

Voici la liste des milieux au rein autoclavé que nous avons éprouvés : gélose-sérum, gélatine-sérum, bouillon-sérum, sérum hémicoagulé, et les diverses géloses au tournesol, rouge neutre, vert de malachite, sous-acétate de plomb.

Nous n'énumérerons pas séparément les caractères de culture de *Sp. microdentium* dans chacun de ces milieux. La description déjà donnée pour les milieux au rein frais reste exacte pour chacun d'eux, en tenant compte seulement d'un d'un certain retard dans le départ de la culture et d'une diminution assez notable de sa richesse. Ces milieux sont cependant assez fidèles pour pouvoir suffire à la détermination et à l'entretien des souches.

## 3° MILIEUX AU SÉRUM SANS REIN.

Il était intéressant de rechercher si *Sp. microdentium* pouvait se développer dans les milieux précédents, mais privés de fragment de rein frais ou autoclavé.

Comme le fragment d'organe agit principalement en favorisant l'anaérobiose par l'action réductrice qu'il exerce, on pouvait supposer que le spirochète se développerait dans des milieux au sérum, lorsqu'on y réaliserait les conditions physiques ou chimiques de l'anaérobiose. L'expérience a généralement vérifié cette hypothèse.

C'est ainsi que la culture de *Sp. microdentium* peut être obtenue dans ces conditions soit en milieu liquide, soit en milieu solide

A. MILIEUX LIQUIDE SANS REIN. — Nous avons utilisé comme milieu liquide le bouillon sérum, la culture étant réalisée dans le vide ou en présence de substances réductrices.

1° *Bouillon sérum dans le vide.* — Si l'on fait le vide dans du bouillon sérumensemencé avec *Sp. microdentium*, la culture réussit, à condition d'employer du bouillon frais ou régénéré et de pratiquer un vide soigné. La culture est longue à partir. Le trouble initial n'apparaît le plus souvent qu'après cinq à huit jours d'étuve. Il ne prend son complet développement, aboutissant à la précipitation et à la digestion du sérum qu'en dix à quinze jours.

La culture a la même odeur putride qu'en bouillon sérum rein.

2° *Bouillon sérum additionné de substances réductrices.* — Nous avons obtenu des cultures de *Sp. microdentium* en bouillon sérum à l'acide pyruvique, en sulfure de calcium et en bouillon sérum gélosé.

a) *Bouillon sérum à l'acide pyruvique.* — L'un de nous a recherché à l'époque avec A. Berthelot si le fragment d'organe pouvait être remplacé par un réducteur choisi dans la série de l'acide pyruvique.

Des tubes de bouillon sérum dans lesquels la souche de *microdentium* utilisée ne se développait en aucune manière



(sous huile de vaseline) ont donné d'excellentes cultures après addition de quelques gouttes d'une solution de pyruvate de soude. Les cultures (trouble très net en bouillon) correspondaient par le délai de leur développement et l'intensité de leur croissance à celles obtenues en bouillon au rein autoclavé. Elles étaient par conséquent plus lentes à partir et moins riches que celles obtenues dans les milieux au rein frais.

b) *Bouillon sérum au sulfure de Ca.* — Des résultats analogues, quoique un peu inférieurs, ont été obtenus en ajoutant à des tubes de bouillon sérum des traces de sulfure de Ca.

c) *Bouillon sérum additionné de traces de gélose.* — Klodnitzky a montré que l'on pouvait cultiver en bouillon les anaérobies, sans procéder au vide, en ajoutant au milieu 0 gr. 1 p. 100 de gélose. Ce milieu acquiert de la sorte des propriétés réductrices (3) telles, que les anaérobies les plus exigeants, *B. œdematiens*, par exemple, s'y développent rapidement et avec abondance.

En bouillon K, *Sp. microdentium* se développe facilement. En vingt-quatre à quarante-huit heures on voit apparaître un trouble qui est localisé d'abord dans le fond du tube et qui tend à remonter progressivement vers la surface. Ce trouble, fort net, est entouré d'un halo plus flou et l'aspect de la culture n'est pas sans rappeler celui des colonies en gélose sérum rein.

Le sérum du milieu précipite lentement en quinze-vingt jours. La culture a une odeur putride.

La mobilité des spirochètes est moins prononcée et moins durable qu'en bouillon sérum rein ou qu'en bouillon sérum dans le vide.

B. MILIEUX SOLIDES SANS REIN. — Nous avons encore obtenu la croissance de *Sp. microdentium* en gélose sérum sans rein et en sérum hémicoagulé sans rein (milieu de Schereschewsky).

a) *Gélose sérum sans rein.* — Dans ce milieu *Sp. microdentium* se développe, mais plus lentement et plus pauvre-

(3) Il est aisé de vérifier les propriétés réductrices du milieu de Klodnitzky. Il suffit d'ajouter au milieu quelques gouttes d'une solution stérilisée de bleu de méthylène et de le porter à l'étuve. En quelques heures, dans toute la zone anaérobie le milieu est décoloré.

ment qu'en gélose sérum rein. Les colonies sont moins délimitées, plus confluentes et plus floues.

b) *Sérum hémicoagulé sans rein*. — Le *Sp. microdentium* pousse également en milieu de Schereschewsky, mais le départ est souvent difficile, parfois beaucoup plus lent que dans le même milieu additionné de rein. Le sérum est lentement liquéfié.

Pour conclure, en condition anaérobie, on peut cultiver le *microdentium* dans des milieux au sérum et privés de fragment d'organe. Mais la culture dans ces conditions s'effectue plus lentement que dans les milieux additionnés de rein. Elle n'est du reste possible que pour des souches déjà entraînées sur milieux de Noguchi. Les repiquages sont suivis d'insuccès plus fréquents. Ces milieux ne sont pas en général recommandables pour la conservation des souches.

#### 4° MILIEUX PARTIELLEMENT DIGÉRÉS.

Les observations précédentes établissent sans conteste la supériorité des milieux au rein frais sur ceux au rein autoclavé et plus encore sur ceux privés de rein. L'influence favorisante du rein frais ne tient donc pas exclusivement à l'anaérobiose qu'il produit. Nous avons pensé que l'autolyse survenant dans les milieux de Noguchi pouvait créer pour les spirochètes un facteur de culture particulièrement favorable. D'autre part, nous n'ignorons pas l'action favorisante exercée sur les spirochètes par maintes bactéries protéolytiques.

Ces considérations nous ont amené à penser que *Sp. microdentium* pourrait se développer dans des milieux sans rein ni réducteurs spéciaux, mais dont les albumines auraient déjà subi un début de digestion. Cette hypothèse s'est trouvée vérifiée par l'expérience suivante :

Quelques gouttes de trypsine Grüber (en solution faiblement alcaline et filtrée à travers une bougie L<sup>3</sup>) sont ajoutées à des tubes de sérum coagulé (milieu de Löffler incliné) dans lesquels avaient été préalablement versés environ 10 cent. cubes d'eau physiologique stérile. Les tubes de milieu sont portés à l'étuve jusqu'à ce que le sérum coagulé ait subi un début de digestion manifeste. Celle-ci se traduit par un éclaircissement de sérum dans la partie supérieure et sur les bords du tube.

Après avoir contrôlé la stérilité du milieu, on y ensemence, sous huile de vaseline, une culture jeune (trois-cinq jours) de *Sp. microdentium*. Le développement s'effectue très normalement et la digestion de sérum par les spirochètes se poursuit jusqu'à la désintégration totale du milieu.

Naturellement, en sérum de Löffler-eau physiologique non attaqué par la trypsine, le développement des spirochètes est impossible.

Nous considérons cette expérience comme très instructive. Elle nous permet de comprendre comment en présence de *B. fusiforme* (microbe faiblement protéolytique) le *microdentium* se développe d'emblée en gélose ascite sans rein (voir chap. Isolement), alors que dans ce même milieu une culture pure immédiate n'est pas réalisable.

Nous comprenons encore l'influence favorisante du fusiforme sur la germination des granules spirochétogènes.

Ces faits très importants pour la biologie du *microdentium* se révéleront capitaux pour l'étude des spirochètes moins protéolytiques comme par exemple *Sp. skoliodonta*.

Enfin, nous saisissons pourquoi certains milieux de culture déjà partiellement digérés se révèlent des milieux de choix pour l'isolement des spirochètes. La gélose MS qui est l'un des meilleurs milieux dont nous disposons est préparée avec de la viande de bœuf que l'on a laissé macérer vingt-quatre heures et qui a par conséquent déjà subi l'action protéolytique des diastases microbiennes.

#### VITALITÉ DES CULTURES.

La vitalité de *Sp. microdentium* en culture dépend de l'âge de celle-ci, de la nature du milieu et de la température.

Ainsi une culture en bouillon sérum de cheval rein conservée à 33° peut être repiquée avec succès pendant un mois et demi. Passé ce délai, la souche sera d'ordinaire perdue.

Une culture du même organisme en bouillon ascite rein, conservée à 33°, sera encore vivante plusieurs mois après son ensemencement (ensemencements réussis après cinq mois d'étuve).

Une culture en sérum de cheval hémicoagulé rein reste rare-

ment vivante plus de deux mois à 33°. Sortie de l'étuve au huitième jour et conservée dans l'étuve à gélatine (25° environ), une culture dans ce même milieu peut être repiquée avec succès pendant plus de six mois.

D'une façon générale les milieux solides conviennent mieux pour la conservation des souches que les milieux liquides. Pratiquement nous repiquons nos souches tous les mois.

#### CYCLE ÉVOLUTIF.

*Sp. microdentium* constitue l'un des plus mauvais matériels qui soient pour l'étude du cycle évolutif des spirochètes. Sa petite taille, qui le rend difficilement observable, son pouvoir protéolytique qui lui fait digérer rapidement le milieu et y introduire des substances étrangères, lesquelles troublent la pureté des imprégnations sont autant d'obstacles qui rebutent l'observateur. Nous avons pu cependant vaincre en partie ces difficultés et suivre dans ses grandes lignes le cycle évolutif du microorganisme.

Nous avons déjà indiqué que lorsqu'on repique une culture jeune de *Sp. microdentium*, dans un milieu convenable, le départ de la culture était instantané et que l'on obtenait une culture fille déjà manifeste au bout de vingt-quatre heures d'étuve. L'observation microscopique rend facilement compte de ce phénomène.

Les formes jeunes introduites dans le nouveau milieu sont très mobiles, en pleine division transversale, simple ou multiple. Les processus de scissiparité se continuent sans arrêt dans le nouveau milieu et la culture fille, en quelques heures, a rattrapé en richesse et en vigueur celle dont elle était issue. En ayant soin de faire des repiquages assez rapprochés, on peut maintenir indéfiniment cet état d'intense vitalité.

Mais si on laisse vieillir quelques semaines une culture à l'étuve ou dans l'armoire, lorsqu'on la repique en milieu neuf, tout se passe autrement. Il faut cinq, six, parfois huit jours et plus pour obtenir une culture manifeste. L'examen au fond noir montre que plusieurs jours s'écoulent avant l'apparition des premiers éléments mobiles, spirochètes courts à 2, 3 tours de spire, paraissant s'échapper d'amas constitués par des



formes atypiques, filamenteuses ou involuées. L'examen des frottis imprégnés confirme entièrement ces observations. Puis, peu à peu, apparaît dans la culture un nombre toujours plus grand de spirochètes mobiles, de taille normale. Les divisions transversales reprennent suivant un rythme toujours accéléré et la culture atteint le stade de multiplication intense précédemment décrit.

La mise en évidence, sur les frottis imprégnés, de granules spirochétogènes dans les cultures âgées de *Sp. microdentium* (cultures de vingt et un jours en bouillon liquide hydatique rein) nous donne l'explication de ce comportement. Lorsqu'on repique les cultures vieilles, la vitalité des spirochètes est trop affaiblie pour qu'ils se multiplient suivant le mode normal de division transversale simple ou multiple. Les spirochétogènes qui représentent à ce stade les éléments les plus actifs de la culture se multiplient et s'accroissent dans les jours qui suivent l'ensemencement. L'apparition de micro-spirochètes mobiles à 2, 3 tours de spire annonce le début de la croissance visible des granules. Dès que les spirochètes nouveaux sont assez nombreux et vigoureux la phase de scissiparité normale reprend dans la culture.

Les expériences entreprises avec *Sp. calligyra* nous expliquent encore l'action favorisante qu'exerce la croissance du *B. fusiforme* sur le développement du *microdentium*. Nous savons en effet qu'une bactérie auxiliaire (*B. de Shmamine*) favorise au plus haut point la germination des spirochétogènes de *Sp. calligyra*. Le *B. fusiforme* (type Vincent) en favorisant de même les spirochétogènes de *Sp. microdentium* permet souvent le départ d'une souche de spirochète à vitalité amoindrie et qui semblait perdue.

Ces expériences très importantes pour expliquer la biologie de *Sp. microdentium* éclairent également celle de tous les spirochètes de l'association.

#### PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Les caractères cultureux nous permettent déjà de définir les propriétés biochimiques de *Sp. microdentium*.

Nous savons déjà que c'est un protéolytique énergétique.

puisqu'il liquéfie la gélatine, le sérum hémicoagulé et l'albumine d'œuf coagulée. Cette dégradation des albumines s'accompagne d'un dégagement de  $H^2S$ , démontré par le noircissement des milieux au Pb. Dans les cultures âgées apparaissent des cristaux d'acides aminés.

Cette digestion s'effectue en milieu acide. En effet, si l'on suit l'évolution du pH, on constate que, dans une culture en bouillon sérum rein, celui-ci passe de 7,8 (avant l'ensemencement) à 6,2-6,3 en huit jours. Cependant, les très vieilles cultures ont une réaction alcaline. Sans doute, les sels ammoniacaux formés sont-ils la cause de cette inversion de la réaction.

Il est probable que l'involution, puis la mort des spirochètes, est liée aux variations du pH. En effet, dans les milieux où les spirochètes restent le plus longtemps vivants, les variations du pH sont moins marquées que dans ceux où ils succombent rapidement.

Enfin, un problème biochimique doit retenir notre attention. Celui de l'attaque des albumines lors des premières cultures ou du réensemencement des cultures vieilles. Dans ces conditions, les albumines du sérum ne sont pas attaquées et, par conséquent, la culture ne part que si l'action protéolytique du *microdentium* est entraînée :

Ou 1° par un microbe protéolytique favorisant (fusiforme par exemple) ;

Ou 2° par une diastase (trypsine) ;

Ou 3° par l'autolyse d'un tissu frais.

Les fragments d'organe non chauffés se révèlent les excipients de choix pour la culture des spirochètes parce qu'ils favorisent la culture, à la fois par les ferments qu'ils libèrent au cours de l'autolyse, et par l'action réductrice qu'ils exercent.

*Sp. microdentium* peut, du reste, s'affranchir, dans une certaine mesure, de ces conditions spéciales de culture, puisqu'au cours des repiquages nous le voyons s'adapter à des milieux au rein autoclavé et même à des milieux sans rein.

Pour conclure, *Sp. microdentium* nous apparaît comme un protéolytique énergique, liquéfiant les albumines en milieu

acide, mais dont l'entrée en action doit être préparée par l'intervention de diastases étrangères. Les cultures filles, fréquemment repiquées, peuvent s'affranchir plus ou moins de cette condition particulière.

En ce qui concerne les hydrates de carbone, nous avons pu établir que *Sp. microdentium* ne faisait fermenter aucun des sucres courants. Nous avons ensemencé différentes souches bien adaptées dans le milieu suivant :

Eau peptonée (peptone Chapoteaut 2 p. 100), gélosée à 1 p. 100 et additionnée après stérilisation d'un tiers de sérum de mouton. On ajoute au milieu quelques gouttes de tournesol stérile et II à IV gouttes d'une solution concentrée stérile (par filtration) des produits à étudier. Les produits éprouvés ont été : glucose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, lactose, dulcité, mannite et inuline.

Dès le départ de la culture, le tournesol est réduit et le milieu décoloré, en partant de la profondeur vers la surface. Puis, au bout de quelques jours, le milieu se réoxyde peu à peu et le quart supérieur du tube reprend une coloration bleue. Dans un tube témoin (eau peptonée-gélosée-sérum-lactose-tournesol). *B. coli* rougit fortement le milieu. Nous pouvons donc conclure que, sur les sucres étudiés, l'action fermentative est nulle.

#### Etude du potentiel d'oxydo-réduction des cultures de *Sp. microdentium*.

Les cultures en milieu solide gélose-sérum-rein réduisent la plupart des indicateurs colorés. Les indicateurs suivants ont tous été réduits : violet de Lauth, bleu de crésyle, bleu de toluidine, bleu de méthylène, tétrasulfonate d'indigo, trisulfonate d'indigo, disulfonate d'indigo, violet de crésyle.

Dans la partie profonde de la culture, la phénosafranine vire au brun ; le vert Janus au jaune ; le rouge neutre au jaune fluorescent.

Le potentiel d'une culture en milieu solide a été étudié aussi par la méthode électrométrique, par l'un de nous et Marc Daufresne, en utilisant l'appareillage déjà décrit pour l'étude du milieu MS. Le graphique (fig. 9) fait ressortir nette-

ment que *Sp. microdentium* abaisse rapidement le potentiel du milieu jusqu'à  $-285$  millivolts au quatrième jour (électrode basse) ; l'abaissement au niveau de l'électrode haute est plus lent et plus faible.

### POUVOIR PATHOGENE.

Les souches de *Sp. microdentium* que nous avons isolées étaient habituellement dépourvues de tout pouvoir pathogène.

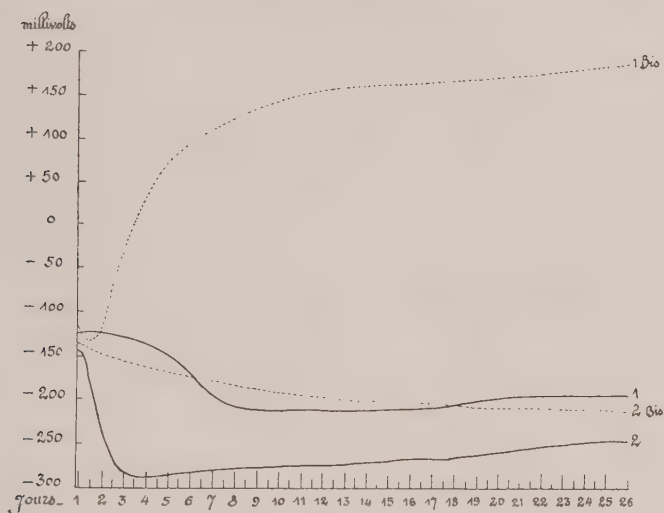


FIG. 9. — Graphique n° 3. Mesures potentiométriques d'une culture de *Sp. microdentium*.

——— *Sp. microdentium* : 1, électrode haute; 2, électrode moyenne.  
 ~~~~~ Tube témoin : 1 bis, électrode haute; 2 bis, électrode moyenne.

Ainsi l'injection au cobaye de 2 à 4 cent. cubes de culture (de six à huit jours en bouillon sérum rein), sous la peau ou dans le péritoine, l'injection intraveineuse au lapin de doses allant jusqu'à 10 cent. cubes, ne sont suivies d'ordinaire d'aucun accident.

Quelques souches, cependant (Cr., Mad., GP<sup>2</sup>), ont présenté un faible pouvoir pathogène. Si l'on injecte 4 cent. cubes d'une culture jeune, provenant d'une de ces souches, sous la peau de l'abdomen du cobaye, on constate, le lendemain de l'injection, un œdème mou, étendu à presque toute la



surface abdominale. L'œdème rétrocede en quarante-huit heures et seule persiste une induration de la paroi, qui disparaît spontanément en huit à dix jours. Si l'on sacrifie l'animal avant la guérison, on constate, au niveau du derme induré, des suffusions sanguines dans les tissus conjonctifs et musculaires. Les spirochètes n'y sont pas rares et peuvent être

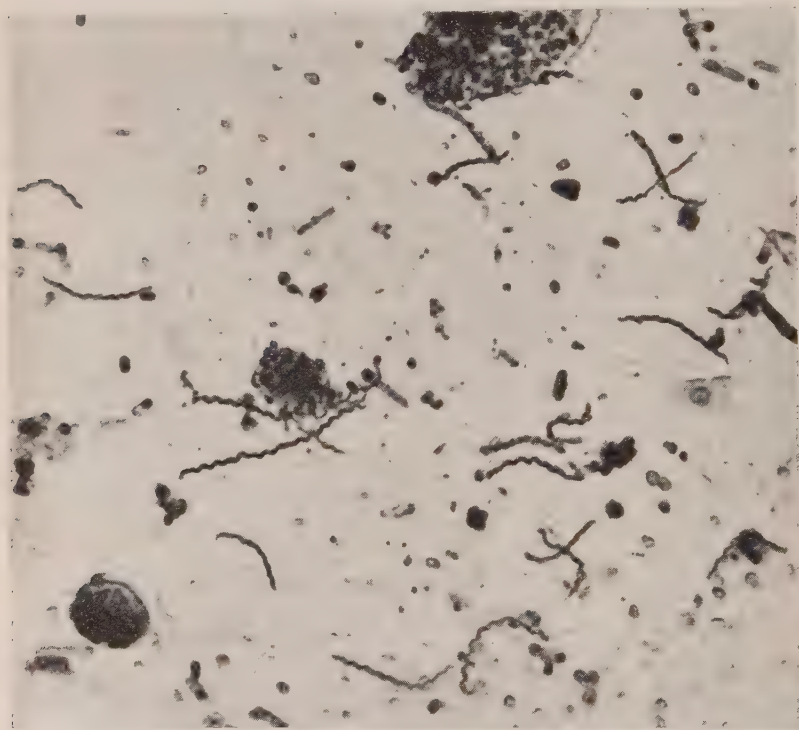


FIG. 10. — Frottis de sécrétions musculaires provenant d'un cobaye mort de gangrène, provoquée par l'association B. de Schmorl + *Sp. microdentium* (souche Mad...), coloration Fontana-Tribondeau modifié (Photo Jeantet). Les spirochètes sont plus nombreux que les formes bacillaires.

observés vivants au fond noir ou mis en évidence sur des frottis imprégnés. Dans aucun cas, la lésion congestive locale n'aboutit à la suppuration ou à la gangrène.

Mais si la virulence de *Sp. microdentium* en culture pure est nulle ou très faible, il n'en est plus de même lorsqu'on inocule ce germe dans certaines conditions d'association.

La première association réalisée fut celle de *Sp. microdentium* avec le bacille fusiforme (type de Vincent), lequel favorise si nettement, comme nous l'avons vu, la culture de l'organisme spiralé.

Si l'on inocule sous la peau du cobaye ou du lapin un mélange de cultures (2 cent. cubes + 2 cent. cubes) d'une souche faiblement virulente de *Sp. microdentium* et de ce fusiforme (isolément non pathogène), l'inoculation est suivie de la formation en quelques jours d'un abcès putride, où pullulent les deux microorganismes. Cette expérience, répétée avec différentes souches, ne réussit cependant que si l'on a soin d'utiliser un spirochète qui ne soit pas absolument avirulent. C'est sans doute pour n'avoir pas réalisé cette condition que D. Smith n'a pu constater le pouvoir pathogène de cette association fuso-spirochétique.

Dans une autre série d'expériences analogues, nous avons substitué au bacille fusiforme avirulent, des bacilles anaérobies à pouvoir pathogène marqué. Nous avons expérimenté avec le bacille de Schmorl (4) [bacille de la nécrose] et avec une souche humaine de bacille de Sordelli.

Les expériences avec le bacille de Schmorl ont été conduites en associant des doses non mortelles pour le cobaye de la culture de ce microbe (1/10 de cent. cube) à 2 cent. cubes d'une culture légèrement pathogène de *Sp. microdentium*. Les cobayes inoculés sous la peau avec ce mélange sont morts en quatre jours en présentant des lésions gangréneuses étendues, dans lesquelles le *Sp. microdentium* était infiniment plus abondant que le bacille de la nécrose.

Des expériences analogues ont été réussies en utilisant une souche de bacille de Sordelli faiblement pathogène, isolée d'un cancer humain ulcéré de la face. En associant à 2 cent. cubes de la culture du *microdentium* isolé de ce cas avec 1/4 de cent. cube de culture de bacille de Sordelli (dose isolément non pathogène) et en injectant ce mélange sous la peau du cobaye, nous avons tué l'animal en trois jours. Il présentait des lésions gangréneuses et putrides étendues de la paroi abdominale, un

(4) Souche aimablement mise à notre disposition par notre collègue CÉSARI.

œdème rouge marqué, sans bulles de gaz. Le *Sp. microdentium* dominait dans la lésion.

Ajoutons le protocole d'une expérience de D. Smith :

En ajoutant *Sp. microdentium* à un mélange de streptocoque, fusiforme et vibrions (mélange qui ne détermine qu'un petit abcès difficilement transmissible de souris à souris), il obtient un gros abcès nécrotique facilement transmissible de souris à cobaye à la dose de 0 c. c. 25 seulement.

Il ressort de ces expériences que l'action du *Sp. microdentium* dans des associations microbiennes est d'une importance certaine.

#### AGGLUTININES.

On peut préparer des lapins dont le sérum agglutine fortement *Sp. microdentium* en inoculant dans la veine de l'animal des doses croissantes de culture vivante. On choisit des cultures jeunes de quatre à huit jours en bouillon sérum rein. Les injections sont faites tous les trois jours, les doses vont de 1/2 à 10 cent. cubes, en augmentant chaque fois la dose de 1/2 cent. cube. On réalise ainsi une vingtaine d'injections en deux mois environ. Au bout de ce temps, le sérum est éprouvé et généralement riche en agglutinines (1/700 à 1/1.000).

Nous pratiquons des agglutinations macroscopiques, dont nous contrôlons la lecture par un examen au fond noir. Des cultures jeunes en bouillon sérum rein, utilisées avant la précipitation massive du sérum sont centrifugées. On décante le bouillon de culture et le culot de centrifugation est émulsionné en eau physiologique stérile. L'émulsion doit être faiblement, mais nettement, opalescente. Cette émulsion est distribuée en tubes à hémolyse (à raison de XLIX gouttes d'émulsion par tube) et le sérum ajouté aux dilutions convenables, de manière à réaliser des taux d'agglutination allant de 1/30 à 1/1.000.

Les tubes agités sont portés à l'étuve, en ayant soin, chaque fois, de joindre aux tubes d'expérience un tube d'émulsion témoin non additionné de sérum. Après une à deux heures d'étuve, les tubes sont mis au frais et l'on procède, une demi-heure après, à la lecture des résultats.

Nous avons préparé 3 sérums agglutinants, avec 3 souches

de *microdentium* (Mad., B<sup>2</sup>, GP<sup>2</sup>). Ces 3 sérums ont agglutiné fortement les souches homologues, au même taux un bon nombre des souches étudiées et à un taux plus faible certains autres échantillons.

A titre d'exemple, nous publions le tableau d'une de nos expériences.

Sérum agglutinant anti-microdentium  
préparé avec la souche Mad...

| SOUCHES                     | TITRE DES DILUTIONS |       |       |       |        |        |
|-----------------------------|---------------------|-------|-------|-------|--------|--------|
|                             | 1/50                | 1/100 | 1/250 | 1/500 | 1/1000 | 1/2000 |
| Mad... . . . .              | ++++                | ++++  | +++   | +++   | ++     | +      |
| Ap... . . . .               | ++++                | ++++  | ++    | ++    | +      | —      |
| B <sup>2</sup> ... . . . .  | +++                 | ++    | ++    | +     | —      | —      |
| GP <sup>2</sup> ... . . . . | ++++                | ++    | +     | —     | —      | —      |
| Fauch... . . . .            | ++                  | +     | —     | —     | —      | —      |
| Nata... . . . .             | +++                 | +++   | +++   | ++    | —      | —      |
| B <sup>7</sup> ... . . . .  | +++                 | +++   | ++    | +     | —      | —      |
| Barj... . . . .             | —                   | —     | —     | —     | —      | —      |

Comme il est de règle en pareil cas, les taux limites d'agglutination pour les différentes souches hétérologues ont différé suivant les sérums et les souches étudiées. Une seule souche (Barj.) n'a été agglutinée par aucun des 3 sérums. Cet ensemble de faits laisse prévoir l'existence de races de *microdentium* distinguables par les agglutinines.

Ajoutons, enfin, qu'aucun spirochète appartenant à d'autres espèces (*ambigua*, *comandoni*, *macrodentium*, *calligyra*, etc.) n'a agglutiné après contact avec les sérums antimicrodentium. Les épreuves d'agglutination peuvent donc rendre les plus grands services pour l'identification des souches de spirochètes.

#### POSITION DANS LA SYSTÉMATIQUE.

L'ensemble des caractères morphologiques, cultureux, biologiques définit nettement le *Sp. microdentium* : deux espèces de spirochètes buccaux pourraient être confondus avec lui. Le *Sp. ambigua* (nov. sp.) lui ressemble par ses dimensions et son apparence, surtout sur les frottis colorés. Il s'en distingue.



comme nous le verrons dans un prochain mémoire, par l'ensemble de ses propriétés biochimiques et biologiques.

*Sp. mucosa* (*Tr. mucosum* Noguchi) serait, d'après cet auteur, identique à *Sp. microdentium* et n'en différerait que par la propriété de sécréter du mucus, lequel donne aux cultures un aspect filant caractéristique. Celui-ci s'observe au mieux lorsqu'on fragmente la gélose où a poussé ce germe. Les fragments du milieu restent unis par de fins tractus de mucine.

Nous n'avons jamais isolé *Sp. mucosa* de Noguchi. Par contre, dans la culture de *Sp. microdentium* GP<sup>2</sup> contaminée accidentellement par un bacille Gram négatif du groupe du bacille de Friedländer, nous avons constaté avec évidence le caractère considéré comme distinctif par Noguchi pour *Sp. mucosa*. La culture impure avait un aspect filant et visqueux tout à fait remarquable. Isolée à nouveau, elle a perdu ce caractère.

Nous ne pouvons pas croire qu'un observateur de la valeur de Noguchi se soit mépris et ait décrit comme *Sp. mucosa* une souche impure de *Sp. microdentium*. Mais, étant donné que la souche originelle n'a pas été conservée, nous craignons qu'il ne soit maintenant fort difficile, à moins d'une trouvaille heureuse (5) de résoudre jamais ce problème bactériologique.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- BERTHELOT (A.) et SEGUIN (P.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **6**, 1924, p. 341.  
FAUFRESNE (M.) et VINZENT (R.). *C. R. Soc. Biologie*, **128**, 1938, p. 773.  
KLODNIZKY (N.). *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 486.  
KRITCHEVSKY (B.) et SEGUIN (P.). *Revue de Stomatologie*, **22**, novembre 1920 ; **27**, 1925. *L'Odontologie*, novembre 1920. *Dental Cosmos*, septembre 1921 ; mai et juin 1924.  
MANOUELIAN (Y.). *C. R. Soc. Biologie*, **104**, 1930, p. 249. *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 698.  
NOGUCHI (H.). *Journ. Exper. Medic.*, **15**, 1912, p. 81 ; **16**, 1913, p. 199.

(5) D. SMITH assure avoir isolé ce germe ; mais la description qu'il en donne en une ligne : « En culture pure il produit de la mucine en plus d'une odeur fétide caractéristique » (*loc. cit.*, p. 6), est à notre avis trop brève pour suffire à authentifier ce germe. Une description comparative détaillée s'imposerait.

- PETTIT (A.). *Contribution à l'étude des Spirochétidés*. Chez l'auteur, 70, rue Julien, Vanves, Seine, 1929.
- PROCA (G.), DANILA (P.) et STROE (A.). *C. R. Soc. Biologie*, **72**, 1912, p. 895.
- SCHERESCHESKY. *Deut. Med. Wochenschrift*, 1909, pp. 835 et 1260.
- SEGUIN (P.). *C. R. Acad. des Sciences*, **171**, 1920, p. 1243. *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 1930, pp. 247 et 836. *Odontologie*, **75**, 1937, p. 145.
- SEGUIN (P.) et VINZENT (R.). *C. R. Soc. Biologie*, **121**, 1936, p. 408.
- SHAMAMINE. *Cent. f. Bakter.*, **65**, 1912, p. 311.
- SMITH (D.). *Oral spirochetes and related organisms in Fusospirochaetal Disease*. Baillière, Tyndall et Cox, London, 8 Henrietta Street, Covent Garden, W. C. 2.
- VINZENT (R.) et DAUFRESNE (M.). *C. R. Soc. Biologie*, **126**, 1934, p. 490 ; **128**, p. 770.
- VINZENT (R.) et LEHMANS. *Revue de stomatologie*, **38**, mars 1936.
- VINZENT (R.), SEGUIN (P.) et DAUFRESNE (M.). *C. R. Soc. Biologie*, **121**, p. 406.
- VINZENT (R.) et SEGUIN (P.). *C. R. Soc. Biologie*, **121**, 1936, p. 488.

## **CINQ BACILLES DE STÉFANSKY SUFFISENT POUR INFECTER LE RAT BLANC**

par E. MARCHOUX et V. CHORINE.

Lange et Lydtin [1] arrivent à infecter constamment le cobaye avec 0 milligr. 000.000.01 de certaines souches bovines de bacilles tuberculeux très virulents. Par ensemencement sur les milieux à l'œuf les auteurs évaluent le nombre de germes vivants contenus dans 0 milligr. 000.000.01. de 1 à 10 bacilles.

A. Boquet [2] a réussi à tuberculiser le cobaye avec 0 milligr. 000.000.01 de la souche bovine Laporte. Saenz et Costil [3], avec 0 milligr. 000.000.05 de la souche bovine Vallée arrivent à infecter 1 cobaye sur 4.

D'après la numération de Calmette, 1 milligramme de bacilles tuberculeux frais correspond approximativement à une quarantaine de millions d'éléments [4].

D'après l'examen de ces expériences et de certaines autres, comme celles de Lewenthal et de Findel, il ressort que le nombre de bacilles tuberculeux nécessaires pour infecter le cobaye doit être très petit. Un seul germe d'une culture très virulente suffirait peut-être à tuberculiser le cobaye.

La lèpre, en raison de l'extension réduite qu'on lui connaît, paraît moins infectieuse que la tuberculose. Faut-il admettre que les bacilles lépreux soient moins virulents que les bacilles tuberculeux, ou que la transmission des germes se réalise moins facilement ?

Pour résoudre ce problème, nous avons étudié dans ce travail la dose minima du virus de la lèpre du rat capable de réaliser l'infection chez le rat blanc.

EXPÉRIENCE 1230. — Le 14 août 1937 on sacrifie un rat infecté quatre mois auparavant par injection sous-cutanée de bacilles de Stefansky. Le lépromme prélevé est broyé dans l'eau physiologique. L'émulsion est centrifugée à faible vitesse pendant trois minutes pour la débarrasser

des grosses particules de tissus. Le liquide surnageant est séparé et centrifugé à nouveau, cette fois à grande vitesse pendant vingt minutes. Le culot de la deuxième centrifugation contenant des bacilles presque libres de débris tissulaires est émulsionné dans l'eau physiologique et centrifugé encore une fois à faible vitesse pendant cinq minutes pour enlever les amas de bacilles. L'émulsion ainsi obtenue est très homogène et les frottis montrent qu'elle ne contient ni débris tissulaires, ni bacilles agglutinés, que les germes sont bien isolés.

Nous avons fait la numération des germes contenus dans cette émulsion par deux méthodes différentes : premièrement dans un hématimètre de Thoma-Zeiss, une demi-heure après le remplissage de l'appareil. L'émulsion a été diluée pour cela à 1 p. 40 dans une solution de bleu de méthylène assez faible. Cette méthode nous donne une valeur égale à 600.000.000 de germes par centimètre cube dans l'émulsion ; deuxièmement, nous déterminons le nombre des germes par rapport à celui des globules rouges préalablement comptés. Ce procédé nous a permis de fixer le nombre des bacilles de Stéfansky à 800.000.000 par centimètre cube. On voit que ces deux résultats sont assez rapprochés pour que nous puissions considérer qu'ils se contrôlent l'un par l'autre. La deuxième méthode est certainement plus près de la vérité que la première, car avec le compte-globules de Thoma-Zeiss quelques bacilles peuvent passer facilement inaperçus. Pour cette raison, nous avons évalué arbitrairement notre émulsion à 750.000.000 par centimètre cube. On la dilue de telle façon que 1 cent. cube en contienne 500, 50 et 5. Les dilutions successives ont été préparées dans des tubes à essais, chaque dilution avec une nouvelle pipette stérile.

5 rats reçoivent sous la peau de l'aîne droite 1 cent. cube de l'émulsion contenant 5 bacilles par centimètre cube.

5 autres rats, 1 cent. cube d'émulsion titrée à 50 bacilles par centimètre cube.

La troisième série de 5 rats est inoculée avec 1 cent. cube de l'émulsion à 500 microbes par centimètre cube.

Voici les résultats des inoculations :

*Rats inoculés avec 500 bacilles.* — Le 15 décembre 1937, quatre mois après l'inoculation, on trouve chez ces animaux des petits grains de plomb dans l'aîne droite. Le 3 mars 1938, les 4 rats présentent au point d'inoculation des nodules gros comme un petit pois ; le cinquième paraît normal.

Le 26 avril 1938, un rat est mort. A l'ouverture de la peau on trouve, au point d'inoculation, un lépromme en nappe de 3-4 millimètres d'épaisseur et de 2 centimètres environ de diamètre. Les ganglions axillaires droits, augmentés de volume, contiennent de nombreux bacilles acido-résistants. Les autres ganglions d'apparence normale sont libres de toute infection, sauf les ganglions axillaires gauches où la coloration révèle de rares bacilles de Stéfansky. Les organes internes sont indemnes et sans germes.

On voit le degré de l'infection atteint chez ce rat en huit mois et dix jours. L'inoculation faite avec les doses énormes de bacilles qu'on injecte couramment au laboratoire provoque des lésions analogues en un temps à peine plus court : quatre-cinq mois.

Le 23 mai 1938, plus de neuf mois après l'inoculation, l'examen de 4 rats survivants montre que la maladie a progressé sensiblement.



Un rat porte un ulcère, un autre un léprome gros comme une noix et les deux autres un léprome gros comme une amande. Les 5 rats se sont infectés. Chez eux, l'évolution des lésions locales est plus lente que chez les animaux inoculés avec de fortes doses.

*Rats inoculés avec 50 bacilles.* — Un des rats meurt le 5 octobre, à peine deux mois après le commencement de l'expérience, sans microbes acido-résistants dans l'organisme.

L'examen des rats survivants, le 15 décembre, montre que les 4 rats restants portent au point d'inoculation de petits grains de plomb, premiers signes d'un léprome naissant. Le 3 mars 1938, l'état de ces animaux reste stationnaire. Au mois de mai 1938, plus de neuf mois après l'infection, les rats présentent au point d'inoculation de petits nodules caractéristiques. Comparativement avec la série précédente, on peut noter un léger retard dans l'apparition des premiers symptômes, mais surtout dans l'importance de ceux-ci.

Le 13 juin les 3 rats portaient de gros lépromes diffus gros comme des amandes.

*Rats inoculés avec 5 bacilles.* — Un de ces rats meurt le 31 août 1937, à peine deux semaines après l'infection ; il est inutile d'ajouter qu'on ne retrouve aucun signe de lèpre chez cet animal.

Un deuxième rat meurt le 17 février 1938, six mois après l'infection, sans aucun signe apparent de lèpre. A l'ouverture de la peau, on trouve des ganglions inguinaux droits, au point d'inoculation, légèrement augmentés de volume. Les frottis de ces ganglions sont riches en bacilles acido-résistants. L'infection s'est déjà propagée plus loin et les ganglions axillaires droits, de taille normale, contiennent d'assez nombreux germes. L'examen des autres parties du système lymphatique et des organes internes demeure négatif.

Le troisième rat est mort le 9 avril 1938, presque huit mois après l'infection ; on ne relève aucun symptôme apparent de lèpre. A l'ouverture de la peau, on rencontre un petit nodule au point d'inoculation, gros comme une lentille et très riche en germes acido-résistants. Les autres ganglions et les organes internes se montrent indemnes de toute infection.

Le dernier examen, fait le 13 juin 1938, montre que les 2 rats survivants présentent, au point d'inoculation, des nodules lépreux gros comme des amandes.

Tous les animaux inoculés avec 5 germes ont contracté la maladie.

Nous pouvons conclure que 5 bacilles lépreux suffisent à infecter sûrement l'animal. Peut-être un seul germe bien placé suffirait-il à provoquer l'infection. C'est ce que nous nous proposons de vérifier.

Quand on compare ces résultats avec ceux des expériences analogues pratiquées avec le bacille tuberculeux provenant de souches très virulentes, il ressort nettement que le virus lépreux est aussi actif que celui de la tuberculose.

## CONCLUSIONS.

1° Cinq bacilles de Stéfansky suffisent à infecter le rat blanc quand ils sont introduits par voie sous-cutanée.

2° L'inoculation de 500 bacilles en huit mois, de 50 bacilles en neuf mois, de 5 bacilles en dix mois provoque des accidents identiques à ceux que nous obtenons en quatre à cinq mois avec les doses bien plus fortes que nous utilisons communément.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] LANGE (B.) et LYDTIN (K.). *Centralb. f. Bakt.* I abt. Originale, **108**, 1928, p. 22.
- [2] BOQUET (A.). *Gazette Hebd. des Sc. Méd. de Bordeaux*, **57**, 1936, p. 130, 146, 163.
- [3] SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 50.
- [4] CALMETTE (A.). *L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux*. 4<sup>e</sup> édition, revue par A. Boquet et L. Nègre. Masson, édit., Paris, 1936.

## ROLE DE LA CENTRIFUGATION DANS LA RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH PAR LES PROCÉDÉS D'HOMOGENÉISATION

par P. E. DAVY et JEAN C. LEVADITI.

Les crachats des tuberculeux pulmonaires ne contiennent souvent qu'un nombre restreint de bacilles de Koch. Dans ces cas, les « frottis », qui rendent de si grands services dans l'usage courant, par leur simplicité et leur rigueur, donnent des résultats insuffisants malgré des examens prolongés et même répétés. Les procédés d'homogénéisation préconisés par F. Bezançon en France (1) et par Uhlenhut en Allemagne (2) remédient à cet inconvénient. Ils transforment le produit à examiner en un liquide homogène, peu visqueux, qui permet de collecter les bacilles de Koch grâce à l'action de la pesanteur ou grâce à celle, plus puissante, de la centrifugation.

Or, l'homogénéisation du crachat a été l'objet de multiples travaux ; et de fait, premier élément de la technique elle a semblé prépondérante au point de lui donner son nom. Par contre, le rôle de la centrifugation est demeuré au second plan.

De plus, la sensibilité des homogénéisations par rapport aux autres modes de recherche du bacille de Koch a été très discutée, les auteurs paraissant aboutir à des résultats contradictoires. Il semble que les différences relevées dans les faits observés proviennent surtout d'un manque d'unité dans les nombreuses techniques d'homogénéisation et les diverses puissances de centrifugation utilisées. C'est cette précision que nous avons tenté d'établir au cours du présent travail ; celui-ci devant servir de base à une étude clinique (3).

Nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence dans

(1) BEZANÇON. *C. R. Soc. de Biol.*, **55**, 1903, 35, 237, 259.

(2) UHLENHUT et XYLANDER. *Arb. K. Gesundheitsamt*, **32**, fasc. 1, 1909.

(3) P. E. DAVY et J. C. LEVADITI. *Bull. et Mém. de la Soc. Méd. des Hôpitaux*, séance du 24 juin 1938.

quelle mesure les résultats des homogénéisations varient en fonction de la puissance de centrifugation et par conséquent de ces deux éléments principaux : durée et vitesse de rotation. Ensuite, en partant des faits ainsi constatés, nous avons essayé de préciser les conditions dans lesquelles les homogénéisations doivent être réalisées actuellement et les résultats pratiques qu'il est possible d'attendre de cette méthode.

#### VARIATIONS DU POUVOIR DE CONCENTRATION EN FONCTION DE LA VITESSE ET DE LA DURÉE DE CENTRIFUGATION.

Le pouvoir de concentration d'une homogénéisation peut se définir comme étant le rapport du nombre de bacilles constatés sur les étalements après centrifugation, à celui décelé sur les simples frottis. Il est aussi exact de prendre, au lieu du chiffre total de bacilles par lame, le nombre de bacilles par champ, à condition de calculer le chiffre moyen d'après une grande quantité de champs examinés dans les mêmes conditions.

Or, le pouvoir de concentration de l'homogénéisation par rapport au frottis dépend de nombreuses variables qui sont, d'une part, le volume, la température et la viscosité du liquide centrifugé et, d'autre part, les caractéristiques du centrifugeur (forme et dimensions des tubes, distance du fond des tubes à l'axe de centrifugation, temps que met l'appareil à atteindre la vitesse de rotation voulue, etc.). Bref, le pouvoir de concentration d'une homogénéisation par rapport au frottis varie suivant le centrifugeur employé.

La règle que nous cherchons à établir ici doit être indépendante des changements de centrifugeur et ne tenir compte des variations du pouvoir de concentration qu'en fonction de la durée et de la vitesse de rotation. Ce n'est donc pas le frottis que nous devons prendre comme terme de comparaison, puisque le pouvoir de concentration, vis-à-vis de lui, change avec le centrifugeur employé, mais le résultat d'une des centrifugations, la plus faible par exemple.

Ainsi limitée à la comparaison des résultats des diverses puissances de centrifugation, l'expérience donne sur les variations du pouvoir de concentration des renseignements qui,



indépendants des changements de centrifugeurs, seront utilisables dans la pratique courante des laboratoires.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE : Avec 30 cent. cubes de crachats appartenant à un même malade, plusieurs frottis sont effectués et ensuite une homogénéisation est pratiquée suivant la méthode de fluidification de Bezançon et Philibert, avec étuvation. La grande quantité de liquide obtenu (370 cent. cubes environ) permet de faire porter les centrifugations successives, à chaque fois, sur deux tubes à centrifuger, contenant chacun 15 cent. cubes de liquide homogénéisé (2 cent. 5 de hauteur sur 1 cent. 5 de diamètre). Après centrifugation, les culots sont étalés sur lame sur une surface rectangulaire de 1 cent. 5 sur 4 centimètres et colorés au Ziehl-Neelsen. Toutes les lames obtenues, y compris celles des simples frottis, sont examinées avec le même oculaire et le même objectif d'un même microscope. Le total des bacilles par champ, d'un diamètre connu de 0 mm. 144, est calculé en prenant la moyenne sur cent champs examinés.

Les chiffres obtenus sont alors relevés et leurs rapports avec le nombre de bacilles de chaque champ du frottis, puis avec celui de la centrifugation la plus faible (1.000 t/m, 30 minutes), choisie comme unité de comparaison sont calculés.

Nous ne nous sommes pas contentés d'étudier cette variation du pouvoir de concentration chez un seul malade, mais nous avons répété à quatre reprises différentes la série des centrifugations. Au total, plus de 7.000 champs microscopiques ont été examinés et plus de 250.000 bacilles comptés. Les séries de chiffres ont permis d'obtenir chaque fois des courbes semblables, qui ont servi à calculer les chiffres de deux courbes définitives en prenant la moyenne des résultats des quatre séries d'expériences.

Afin de rester dans le domaine pratique, les centrifugations ont été limitées, pour la vitesse, au maximum de 5.000 tours-minute, et, pour la durée, à celui d'une heure, qui sont tous deux aisément atteints par la majorité des centrifugeurs en service (4).

Pratiquement, afin de dissocier les rôles respectifs de la vitesse de rotation et de la durée de centrifugation, il a été effectué, d'une part, des centrifugations à vitesses croissantes et à temps constant, d'autre part, des centrifugations à vitesse constante mais à temps croissants.

(4) Cette étude a été rendue possible par l'emploi d'un centrifugeur muni d'un compte-tours à bulle d'air qui permet de mesurer et de régler la vitesse à laquelle tourne l'appareil.

EXPÉRIENCE I. — *Variation du pouvoir de concentration en fonction de la vitesse de rotation de la centrifugation.*

Dans cette expérience, réalisée suivant la technique qui vient d'être exposée, on compare les résultats obtenus en centrifugeant pendant une demi-heure chaque fois la même quantité de crachats homogénéisés, à des vitesses croissantes de 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 et 5.000 tours-minute (tableau I, courbe I).

TABEAU I. — **Variations du pouvoir de concentration en fonction de la vitesse de rotation.**

|                                                                                                             | VITESSE EN TOURS-MINUTE |       |       |       |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                                                                                                             | 1.000                   | 2.000 | 3.000 | 4.000 | 5.000 |
| Pouvoir de concentration par rapport au simple frottis. . . . .                                             | 1,4                     | 5,8   | 14,2  | 23,9  | 37,9  |
| Pouvoir de concentration par rapport à celui d'une centrifugation à 1.000 tours-minute, 30 minutes. . . . . | 1                       | 4,2   | 10,2  | 17,2  | 27,2  |

*Dans les limites de l'expérience et toutes choses étant égales d'ailleurs (c'est-à-dire le centrifugeur, la température et le volume du liquide centrifugé, ainsi que la durée de centrifugation restant les mêmes), il résulte des chiffres obtenus que le pouvoir de concentration des homogénéisations croît comme le carré de la vitesse utilisée.*

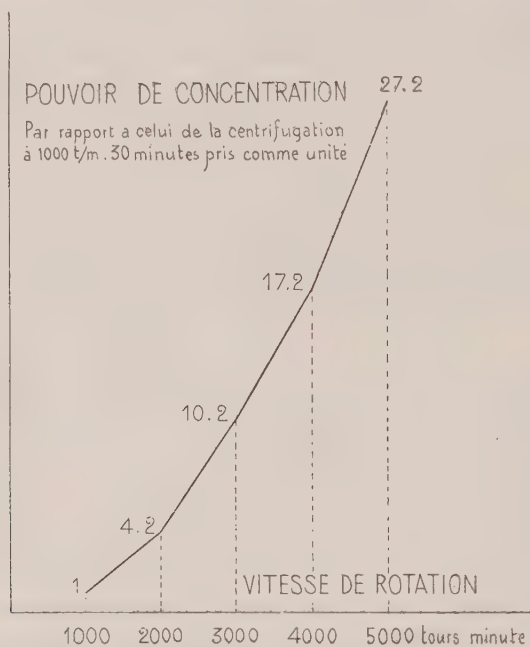
EXPÉRIENCE II. — *Variation du pouvoir de concentration en fonction de la durée de centrifugation.*

Cette expérience, réalisée dans des conditions identiques à celles de la précédente, avec la même suspension bacillaire, mais *en utilisant constamment la vitesse de 5.000 t/m.*, pendant des temps allant de cinq à quatre-vingt-dix minutes, a fourni les résultats suivants (tableau II, courbe II).

*Il en résulte que le pouvoir de concentration croît d'abord rapidement avec la durée de centrifugation, puis tend vers une limite fixe.*

Il est possible de déduire de ces deux expériences, dont les résultats s'accordent avec la théorie physique de la centrifugation,

gation que lorsque seules la vitesse et la durée de centrifugation varient, le pouvoir de concentration augmente tout



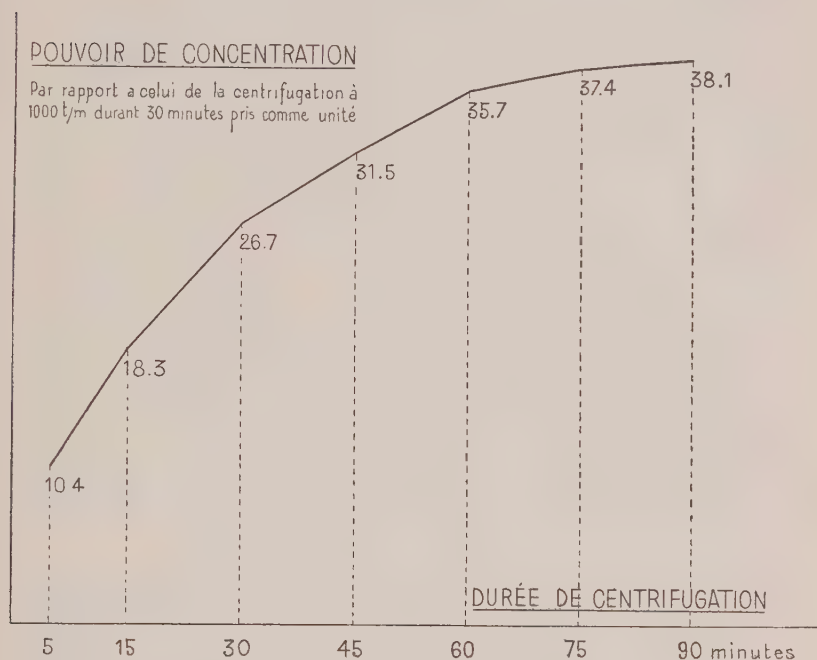
COURBE I. — Variation du pouvoir de concentration en fonction de la vitesse de rotation.

d'abord comme le produit du carré de la vitesse par le temps de centrifugation, et tend ensuite vers une limite dépendant du volume total de liquide utilisé.

TABLEAU II. — Variation du pouvoir de concentration en fonction de la durée de centrifugation.

|                                                                                                                      | DURÉE DE LA CENTRIFUGATION<br>comptée en minutes |      |      |      |      |      |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                                                                                                      | 5                                                | 15   | 30   | 45   | 60   | 75   | 90   |
| Pouvoir de concentration par rapport au simple frottis. . . . .                                                      | 14,8                                             | 26   | 37,9 | 44,6 | 50,6 | 53   | 54   |
| Pouvoir de concentration par rapport à celui d'une centrifugation à 1.000 tours par minute durant 30 minutes . . . . | 10,4                                             | 18,3 | 26,7 | 31,5 | 35,7 | 37,4 | 38,1 |

*Il y a donc intérêt à atteindre, pour un centrifugeur donné, une puissance de centrifugation optima, au-dessous de laquelle*



COURBE II. — Variation du pouvoir de concentration en fonction de la durée de centrifugation.

*le pouvoir de concentration est insuffisant et au delà de laquelle ce même pouvoir de concentration n'augmente plus sensiblement.*

#### VARIATION DE LA SENSIBILITÉ DES HOMOGÉNÉISATIONS EN FONCTION DE LA PUISSANCE DE CENTRIFUGATION.

Après avoir établi l'influence de la puissance de centrifugation sur le pouvoir de concentration, il fallait connaître l'importance des variations de sensibilité qui en résultent pour la mise en évidence du bacille de Koch. Cette comparaison des sensibilités respectives de frottis et d'homogénéisations comporte une série d'expériences au cours desquelles ces diffé-



rentes méthodes ont été effectuées conjointement avec les crachats provenant d'un grand nombre de malades.

Avant d'expérimenter sur la sensibilité des homogénéisations, il est nécessaire de remarquer, d'une part, qu'elles ne permettent d'affirmer que le caractère acido-alcool-résistant des bacilles constatés et non pas leur nature tuberculeuse et, d'autre part, qu'elles comportent de nombreux risques d'erreurs dues à la complexité de la technique. Il existe là une imperfection et une fragilité de la preuve apportée par cette méthode qui nécessitent des précautions de stérilité et une technique bactériologique précise.

**PRÉCAUTIONS DE STÉRILITÉ.** — Afin d'éviter tout risque de contamination des liquides ou de la verrerie, soit par des bacilles tuberculeux, soit par des bacilles acido-résistants saprophytes banaux, l'eau distillée a été seule utilisée et la verrerie a été l'objet d'un nettoyage dont la rigueur fut vérifiée par de nombreuses expériences :

Avant d'être employée, la verrerie, passée à l'autoclave, est nettoyée, puis immergée vingt-quatre heures dans une solution de bichromate de potassium dans l'acide sulfurique (formule de Kuss), rincée à l'eau distillée et enfin stérilisée à la chaleur sèche (5).

**TECHNIQUE DE L'HOMOGENÉISATION.** — Pour l'homogénéisation proprement dite, le procédé de Bezançon et Philibert a été constamment utilisé en l'associant à une étuvation de vingt-quatre heures dont l'intérêt a été révélé par les recherches de Bezançon et Mathieu (6) :

*2 à 3 cent. cubes de crachats sont placés dans une éprouvette stérile et additionnés de dix fois leur volume d'eau distillée, puis d'un nombre de gouttes de lessive de soude égal au nombre de centimètres cubes d'expectoration utilisés. Après agitation, le tout est placé vingt-quatre heures à l'étuve à 37°. Le lendemain, il ne reste qu'à centrifuger les crachats homogénéisés, après leur avoir ajouté le quart du volume total d'alcool à 50°.*

Pour les homogénéisations, nous avons pris comme termes de comparaison deux centrifugations, l'une à basse puissance, tournant à 3.000 t/m pendant trente minutes, l'autre à grande puissance, tournant à 5.000 t/m pendant une heure. Leurs pouvoirs de concentration, calculés à l'aide des résultats précédents, sont dans la proportion de 1 à 3,5.

(5) P. E. DAVY et Jean C. LEVADITI. *Bull. et Mém. de la Soc. Méd. de Passy*, n° 7, 1937, p. 76.

(6) BEZANÇON (F.) et PHILIBERT (A.). *Traité de microbiologie* de Nattan-Larrier, 1, pp. 790 et 792.

EXPÉRIENCE I. — *Comparaison des résultats fournis par un frottis et une homogénéisation complétée par une centrifugation de trente minutes, à la vitesse de 3.000 t/m.*

Cette expérience porte sur un nombre de 31 malades, dont les crachats servent à effectuer simultanément un frottis et une homogénéisation (technique de Bezançon et Philibert avec étuvation, vitesse 3.000 t/m, durée trente minutes). Toutes les lames colorées au Ziehl-Neelsen sont examinées au microscope pendant une demi-heure chacune (tableau I).

TABLEAU I. — **Comparaison du frottis et de l'homogénéisation** (centrifugation à 3.000 tours-minute, pendant trente minutes).

| NOMS         | NOMBRE DE BACILLES CONSTATÉS SUR CHAQUE LAME<br>après examen au microscope |    |    |    |                                               |    |    |    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|----|-----------------------------------------------|----|----|----|
|              | Frottis                                                                    |    |    |    | Homogénéisation                               |    |    |    |
|              | Durée en minutes<br>de l'examen au microscope                              |    |    |    | Durée en minutes<br>de l'examen au microscope |    |    |    |
|              | 5                                                                          | 10 | 15 | 30 | 5                                             | 10 | 15 | 30 |
|              |                                                                            |    |    |    |                                               |    |    |    |
| Ler....      | 4                                                                          |    |    |    | 14                                            |    |    |    |
| Hou....      | 0                                                                          | 5  |    |    | 20                                            |    |    |    |
| Fav....      | 0                                                                          | 0  | 3  |    | 15                                            |    |    |    |
| Bel....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 30                                            |    |    |    |
| Leb....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 10                                            |    |    |    |
| Jil....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 6                                             |    |    |    |
| Fan....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 6                                             |    |    |    |
| M. M....     | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 5                                             |    |    |    |
| Cav....      |                                                                            | 0  | 0  | 0  | 4                                             |    |    |    |
| Bon....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 3                                             |    |    |    |
| Led....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 3                                             |    |    |    |
| Lav....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 2                                             |    |    |    |
| Mon....      | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 0                                             | 0  | 1  |    |
| 18 témoins.. | 0                                                                          | 0  | 0  | 0  | 0                                             | 0  | 0  | 0  |

Sur ces 31 cas, le frottis n'a donc révélé que 3 fois des bacilles acido-résistants, alors que les homogénéisations ont été positives à 13 reprises différentes. En outre, il est à remarquer que les bacilles ont été plus nombreux et plus rapidement constatés sur les lames des homogénéisations que sur les simples frottis.

Il en résulte que l'examen d'un frottis pendant une demi-heure fournit un résultat inférieur à celui d'une homogénéisa-

tion associée à une centrifugation effectuée pendant trente minutes, à la vitesse de 3.000 tours-minute.

EXPÉRIENCE II — Comparaison des résultats de l'homogénéisation après centrifugation à 3.000 t/m pendant trente minutes avec ceux donnés par l'homogénéisation après centrifugation pendant une heure à 5.000 t/m.

Cette expérience effectuée comme la précédente, porte sur un total de 20 malades, pour lesquels furent pratiquées simultanément avec des quantités égales d'une même suspension de crachats homogénéisés, une centrifugation à 3.000 t/m pendant trente minutes, et une autre à 5.000 t/m d'une durée d'une heure. Les culots de centrifugation étalés dans des conditions identiques ont été examinés pendant un même laps de temps (tableau II)

TABLEAU II. — Comparaison du nombre de bacilles constatés après centrifugation à 3.000 tours-minute, trente minutes et à 5.000 tours-minute pendant une heure.

| NOMS                | NOMBRE DE BACILLES PAR LAME |                                        |                                        |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
|                     | Frottis                     | Centrifugation<br>à 3.000 tours-minute | Centrifugation<br>à 5.000 tours-minute |
| Bel... . . . .      | 0                           | 30                                     | Plus de 400.                           |
| Leh... . . . .      | 0                           | 10                                     | Plus de 300.                           |
| Jol... . . . .      | 0                           | 6                                      | Plus de 300.                           |
| M. M... . . . .     | 0                           | 5                                      | 24                                     |
| Cav... . . . .      | 0                           | 4                                      | 20                                     |
| Dec... . . . .      | 0                           | 0                                      | 27                                     |
| Bos... . . . .      | 0                           | 0                                      | 6                                      |
| Mon... . . . .      | 0                           | 1                                      | 6                                      |
| Duc... . . . .      | 0                           | 0                                      | 5                                      |
| Ren... . . . .      | 0                           | 0                                      | 4                                      |
| Pet... . . . .      | 0                           | 0                                      | 4                                      |
| Ame... . . . .      | 0                           | 0                                      | 4                                      |
| Pru... . . . .      | 0                           | 0                                      | 3                                      |
| Gue... . . . .      | 0                           | 0                                      | 3                                      |
| 6 témoins . . . . . | 0                           | 0                                      | 0                                      |

Il apparaît ainsi que le procédé d'homogénéisation associé à une centrifugation à 5.000 t/m pendant une heure (14 résultats positifs) est nettement plus sensible que celui dont la centrifugation est effectuée à 3.000 t/m pendant une demi-heure (6 résultats positifs).

EXPÉRIENCE III. — *Comparaison entre les résultats fournis par des frottis pratiqués pendant six jours consécutifs et une seule homogénéisation complétée par une centrifugation à 3.000 t/m pendant trente minutes.*

Les deux termes de cette comparaison sont dissemblables car les frottis en série, même si leur sensibilité équivaut à celle d'une homogénéisation à 3.000 t/m, pendant trente minutes, offrent une plus grande précision clinique. Ils renseignent en effet sur le caractère continu ou intermittent des émissions bacillaires que ne peut révéler un examen isolé, même s'il est plus sensible.

Cette restriction faite, dans 13 cas différents, nous avons effectué, d'une part, pendant six jours consécutifs, des frottis examinés chacun une demi-heure au microscope et, d'autre part, le sixième jour, une homogénéisation (technique de Bezançon et Philibert, avec étuvation, vitesse 3.000 t/m, durée trente minutes, examinée pendant le même temps (tableau III).

TABLEAU III. — **Comparaison des frottis en série et de l'homogénéisation (centrifugation à 3.000 tours-minute pendant trente minutes).**

| NOMS              | FROTTIS EN SÉRIE PRATIQUÉS<br>6 jours consécutifs |                     |                     |                     |                     |                     | HOMOGENÉISATION<br>3.000 tours-minute<br>pendant<br>30 minutes |
|-------------------|---------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------|
|                   | 1 <sup>er</sup> jour                              | 2 <sup>e</sup> jour | 3 <sup>e</sup> jour | 4 <sup>e</sup> jour | 5 <sup>e</sup> jour | 6 <sup>e</sup> jour |                                                                |
| Ler... .          | —                                                 | +                   | +                   | +                   |                     |                     | +                                                              |
| Hou... .          | —                                                 | —                   | +                   | +                   |                     |                     | +                                                              |
| Fav... .          | —                                                 | —                   | —                   | +                   | —                   | +                   | +                                                              |
| Sœur F... .       | +                                                 | —                   | —                   | +                   |                     | —                   | +                                                              |
| Bon... .          | —                                                 | +                   | —                   | —                   | +                   | —                   | +                                                              |
| Lav... .          | +                                                 | —                   | —                   | +                   | —                   | +                   | +                                                              |
| Led... .          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | +                   | +                   | +                                                              |
| Jol... .          | —                                                 | —                   | +                   | —                   | —                   | —                   | +                                                              |
| Sud... .          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | +                   | +                                                              |
| 4 témoins . . . . | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | —                                                              |

*Il en résulte que des frottis pratiqués en série, pendant six jours consécutifs, et examinés chacun une demi-heure au microscope, offrent une sensibilité équivalente à celle d'une seule homogénéisation associée à une centrifugation de trente minutes à 3.000 t/m.*

Ce fait concorde avec les résultats des expériences réalisées



par G. Kuss, qui montrent l'égale précision des frottis examinés pendant plusieurs heures et des homogénéisations telles qu'il les pratiquait avec des centrifugeurs à vitesse réduite.

EXPÉRIENCE IV. — *Comparaison entre les résultats de frottis pratiqués pendant six jours consécutifs et d'une seule homogénéisation complétée par une centrifugation à 5.000 t/m durant une heure.*

Cette expérience est calquée sur la précédente, mais pour cette comparaison, la centrifugation a été beaucoup plus puissante, tant par sa vitesse, de 5.000 t/m au lieu de 3.000 t/m. que par sa durée, une heure au lieu de trente minutes.

TABLEAU IV. — **Comparaison des frottis en série et de l'homogénéisation (centrifugation à 5.000 tours-minute durant une heure).**

| NOMS             | FROTTIS EN SÉRIE PRATIQUÉS<br>6 jours consécutifs |                     |                     |                     |                     |                     | HOMOGÉNÉISATION<br>5.000 tours-minute<br>pendant<br>une heure |
|------------------|---------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|
|                  | 1 <sup>er</sup> jour                              | 2 <sup>e</sup> jour | 3 <sup>e</sup> jour | 4 <sup>e</sup> jour | 5 <sup>e</sup> jour | 6 <sup>e</sup> jour |                                                               |
| Gug....          | +                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Mon....          | —                                                 | —                   | —                   | +                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Lap....          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | +                   | —                   | +                                                             |
| Lef....          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Grand....        | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Dar....          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Dub....          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Mon....          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| Cou....          | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | +                                                             |
| 3 témoins. . . . | —                                                 | —                   | —                   | —                   | —                   | —                   | —                                                             |

Il en résulte qu'une homogénéisation associée à une centrifugation d'une heure à 5.000 t/m offre une sensibilité supérieure à celle des frottis pratiqués pendant six jours consécutifs et examinés chacun pendant une demi-heure au microscope.

EXPÉRIENCE V. — *Valeur comparée des homogénéisations à la soude et à l'antiformine, en utilisant, dans les 2 cas, pendant une heure, une centrifugation à la vitesse de 5.000 t/m.*

Ces deux procédés, les plus couramment employés, ont été comparés dans le but de préciser leurs fidélités respectives. Les

techniques employées, réalisées avec une égale quantité des mêmes crachats, ont été celle de Bezançon et Philibert, en mettant le produit à homogénéiser vingt-quatre heures à l'étuve, et celle de Calmette-Loeffler (7). A chaque expérience et pour chacune de ces méthodes, les culots de deux tubes à centrifuger, d'égale contenance, ont été étalés dans des conditions identiques et examinés au microscope pendant le même laps de temps (tableau V).

TABLEAU V. — Comparaison des homogénéisations  
à la soude et à l'antiformine (centrifugation d'une heure  
à la vitesse de 5 000 tours-minute).

| NOMS                | NOMBRE DE BACILLES PAR LAME |             |       |
|---------------------|-----------------------------|-------------|-------|
|                     | Frottis                     | Antiformine | Soude |
| M. M.... . . . . .  | 0                           | 7           | 23    |
| Pot... . . . . .    | 0                           | 9           | 21,5  |
| Sœur F... . . . . . | 0                           | 8,5         | 19    |
| Lec... . . . . .    | 0                           | 7,5         | 14,5  |
| Mon... . . . . .    | 0                           | 0,5         | 9,5   |
| Non... . . . . .    | 0                           | 0,5         | 5,5   |
| Lap... . . . . .    | 0                           | 0,5         | 4,5   |
| Ren... . . . . .    | 0                           | 0           | 4     |
| Gue... . . . . .    | 0                           | 0           | 2,5   |
| Dub... . . . . .    | 0                           | 0           | 2     |
| M. M. . . . . .     | 0                           | 0           | 1,5   |
| 4 témoins . . . . . | 0                           | 0           | 0     |

*Il en résulte que, sur 15 cas étudiés, toutes choses étant égales d'ailleurs, et en centrifugeant pendant une heure à 5 000 t/m, la méthode de Bezançon et Philibert (11 cas positifs) a donné des résultats toujours plus fidèles que celle à l'antiformine (7 cas positifs).*

Il ressort de cette seconde série d'expériences que la sensibilité des homogénéisations subit des variations de grande amplitude sous l'influence des modifications de la puissance de centrifugation.

*Ainsi le procédé de Bezançon et Philibert, associé à une centrifugation rapide et prolongée (5.000 t/m pendant une heure) apparaît d'une sensibilité nettement supérieure à celles :*

(7) CALMETTE (A.). *L'Infection bacillaire et la Tuberculose*, 4<sup>e</sup> édition, revue par A. Boquet et L. Nègre, 1936, p. 23.

- 1° de frottis examinés trente minutes au microscope ;
- 2° d'homogénéisations à l'antiformine ;
- 3° de frottis en série pratiqués pendant plusieurs jours consécutifs.

\*  
\* \*

A la suite de ces constatations expérimentales, cette technique d'homogénéisation a été utilisée dans la pratique du sanatorium de Praz-Coutant. Sur un total de 343 tuberculeux pulmonaires ayant séjourné dans ce sanatorium pendant l'année 1937, cette technique a permis de constater que 57 d'entre eux (16,6 p. 100), dont les frottis en série même examinés trente minutes étaient constamment négatifs, expectoraient encore des bacilles. Ces chiffres, plus importants que ceux habituellement constatés, confirment l'influence d'une centrifugation rapide et prolongée sur l'utilité pratique de l'homogénéisation.

#### CONCLUSIONS.

Pour la mise en évidence du bacille de Koch, la valeur pratique des homogénéisations varie avec la puissance de centrifugation utilisée. Leur pouvoir de concentration croît tout d'abord avec la vitesse et la durée de cette centrifugation, puis tend vers une limite en rapport avec le volume de liquide centrifugé.

Il y a donc intérêt à atteindre, pour un centrifugeur donné, une puissance de centrifugation optima, au-dessous de laquelle le pouvoir de concentration est insuffisant et au delà de laquelle ce même pouvoir de concentration n'augmente plus sensiblement.

Actuellement, le procédé de Bezançon et Philibert, avec étuvation, associé à une centrifugation rapide et prolongée (5.000 t/m pendant une heure) réalise les meilleures conditions pour l'utilisation pratique des homogénéisations.

# SÉRO-DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE LA SYPHILIS, DE LA BLENNORRAGIE ET DE LA TUBERCULOSE (1)

par Hugo HECHT (Prague).

## Technique.

Le séro-diagnostic de la syphilis est aujourd'hui relativement perfectionné, celui de la blennorrhagie est assez avancé, mais sur celui de la tuberculose, les opinions diffèrent considérablement. Or, il ne faut pas oublier que les recherches, ainsi que l'examen des différentes méthodes sérologiques doivent être effectués parallèlement aux observations cliniques.

Les examens comparatifs que nous allons exposer ont tous été faits de la même manière pour la syphilis, la blennorrhagie et la tuberculose. Pour la syphilis, nous avons employé la réaction de Wassermann [en titrant exactement l'alexine par la méthode active (*Aktivmethode*)], la réaction colorée de Kahn-Hecht et la réaction de flocculation colorée de Hecht-Müller. Pour la blennorrhagie, nous avons appliqué la méthode active d'après la technique décrite dans le l'Office d'Hygiène Tchécoslovaque. L'activité de l'antigène gonococcique de Kahn et l'antigène de Boquet et Nègre, employés pour la réaction de la tuberculose, provenaient de l'Office d'Hygiène Tchécoslovaque. L'activité de l'antigène tuberculeux a été contrôlée au préalable d'après celle d'un antigène provenant de l'Institut Pasteur de Paris.

(1) Une note préliminaire a été communiquée à la Section sérologique du IV<sup>e</sup> Congrès soviétique des Maladies de la peau et des Maladies vénériennes, Moscou, 27 janvier-3 février 1937.



| Réaction de la syphilis . .   | 0   | +  | 0  | + | 0 | 0  | + | + | TOTAL<br>des<br>cas |
|-------------------------------|-----|----|----|---|---|----|---|---|---------------------|
| Réaction de la tuberculose.   | 0   | 0  | +  | + | + | 0  | + | 0 |                     |
| Réaction de la blennorrhagie. | 0   | 0  | 0  | 0 | + | +  | + | + |                     |
| Nature de la maladie :        |     |    |    |   |   |    |   |   |                     |
| Syphilis I. . . . .           |     | 2  | 1  |   |   |    |   |   | 3                   |
| Syphilis II. . . . .          | 4   | 8  |    | 2 |   |    |   |   | 14                  |
| Syphilis III. . . . .         |     | 4  |    |   |   |    |   |   | 4                   |
| Syphilis IV. . . . .          | 1   | 6  | 1  |   |   |    |   |   | 8                   |
| Syphilis latente. . . . .     | 67  | 19 | 21 | 2 |   |    | 1 |   | 110                 |
| Blennorrhagie guérie. . . . . | 19  |    |    |   | 6 | 4  |   |   | 29                  |
| Diagnostics variés . . . . .  | 80  |    | 11 |   | 4 |    |   | 1 | 96                  |
| Sans diagnostic. . . . .      | 239 | 17 | 72 |   |   | 20 |   |   | 348                 |

0, Réactions négatives; +, réactions positives.

## Observations cliniques.

### TUBERCULOSE PULMONAIRE.

Parmi les 60 cas examinés, 8 ont servi de témoins ; ce sont, pour la plupart, des cas d'asthme bronchique ou d'angine de poitrine. Sur 52 cas de tuberculose certaine, 30 étaient fortement positifs, 4 douteux et 18 négatifs. Le groupe des réactions négatives est le plus intéressant. Il comportait 3 cas de tuberculose guérie, 4 cas de tuberculose stationnaire, 4 cas douteux et 1 cas de tuberculose au tout premier degré. Les 6 autres étaient des cas de tuberculose pulmonaire à différents stades. Pour ces 60 cas, la réaction de la blennorrhagie a été négative. La syphilis n'a été trouvée que deux fois chez un phthisique qui avait une syphilis vieille de plusieurs années, et chez un témoin souffrant d'asthme bronchique et atteint de tabes nettement établi cliniquement. En utilisant une technique irréprochable il est donc possible d'éviter les réactions non spécifiques que l'on craignait tant jadis.

### TUBERCULOSE DE LA PEAU.

9 cas de *lupus vulgaris*, de lupus érythémateux, d'érythème induré de Bazin, de tuberculose du derme et de sarcoïde de Boeck, ont donné quatre fois une réaction de la tuberculose fortement positive, quatre fois une réaction faible et une fois

seulement une réaction négative, celle-ci chez un sujet atteint de *lupus vulgaris*. La réaction de la blennorragie fut toujours négative et ce n'est que dans un cas de *lupus érythémateux* que l'on trouva une réaction faiblement positive de syphilis, mais il s'agissait d'une syphilis latente.

#### LYMPHADÉNITE.

Sur 11 cas parmi lesquels 1 cas de lymphogranulomatose, 3 ont donné une réaction de la tuberculose fortement positive, 3 une réaction douteuse. Il est intéressant de noter que 1 cas positif, avec lymphadénite cliniquement probable, donnait un Frei positif. La réaction de la blennorragie était toujours négative. Un seul sujet montrant des ganglions lymphatiques gonflés, présentait une réaction douteuse de syphilis, sans que l'on pût constater cette maladie dans l'anamnèse, ou cliniquement.

#### INFECTIONS TESTICULAIRES.

Parmi les 22 cas d'origine très variée (blennorragie, tuberculose, syphilis, traumatisme), on constate une seule réaction positive de syphilis. Il s'agissait d'une orchite typique, guérie après un traitement spécifique. La réaction de la blennorragie s'est montrée fortement positive dans 6 cas, faiblement positive dans 1. Tous les sujets étaient atteints de blennorragie aiguë. Cependant, 2 cas de blennorragie certaine ont donné une réaction négative. Voici, décrite brièvement, une de ces observations :

Un jeune homme de vingt-quatre ans contracte une blennorragie qui se complique d'une épididymite dont l'évolution n'est pas tout à fait normale. On soupçonne la tuberculose, qui, après un examen approfondi, fut effectivement constatée. En plus de la tuberculose de l'épididyme, on trouve une tuberculose pulmonaire avancée et jusqu'alors ignorée. Tous les examens sérologiques, même celui qui fut effectué six mois avant la mort, ont toujours été négatifs.

Sur les 22 cas étudiés, 5 donnaient une réaction positive de la tuberculose ; après examen, cette maladie a pu être décelée cliniquement.

## ARTHRITE.

Dans 18 cas d'arthrite de différentes origines, on a enregistré trois réactions positives de syphilis, sept réactions positives de blennorrhagie et trois réactions positives de tuberculose. L'évolution des 3 cas de syphilis a confirmé l'exactitude du diagnostic. Parmi les 7 cas de réaction positive de la blennorrhagie, il y en avait 2 dont l'aspect clinique correspondait à l'arthrite déformante. Le traitement par le vaccin spécifique a déterminé une amélioration de la maladie. Sur les trois réactions positives de la tuberculose, une seule fois la tuberculose pulmonaire a été constatée. Il faut remarquer que dans un seul cas de mono-arthrite, la réaction de la syphilis et la réaction de la blennorrhagie ont été positives. Les deux infections ont été effectivement décelées chez le malade. Il est intéressant de noter qu'à part ce cas, les deux ou trois réactions n'ont jamais été positives simultanément chez un même sujet.

## SCIATIQUE ET NÉURALGIE.

Sur 11 cas de ce groupe, 2 seulement ont fourni les trois réactions négatives. 1 cas de sciaticque donna une réaction positive de la syphilis. Le traitement spécifique a fait disparaître les douleurs. Parmi les 4 cas à réaction de la blennorrhagie positive, 1 a donné également celle de la tuberculose. En tout, 3 cas ont été positifs pour la tuberculose.

## AFFECTIONS OCULAIRES.

11 cas ont été examinés. Deux d'entre eux donnaient la réaction de la syphilis. Le diagnostic clinique indiquait dans 1 cas une amaurose et dans l'autre une kératite parenchymateuse. 1 cas d'iritis présentait une réaction positive de la blennorrhagie, diagnostiquée cliniquement par ailleurs. 2 cas donnaient une réaction forte de la tuberculose, 3 cas une réaction faible. Le diagnostic clinique fut trois fois choroïdite et deux fois iritis. Dans ce groupe de malades, une seule des trois réactions était positive.

## SCLÉROSE MULTIPLE.

Dans un mémoire souvent cité, Gerhartz envisage la sclérose multiple comme une métatuberculose. Il a étudié 13 cas, qui ont tous donné une réaction positive de Besredka, sans présenter des signes cliniques de tuberculose.

Nous avons examiné 9 cas, dont aucun ne donnait la réaction de la syphilis, ni celle de la blennorrhagie. La réaction de la tuberculose était deux fois fortement et deux fois faiblement positive. Ce n'est que dans 2 cas qu'un examen clinique a été possible. Il a permis de soupçonner l'existence de foyers tuberculeux guéris. D'après ces observations, il est vrai restreintes, l'affirmation de Gerhartz ne peut pas être généralisée.

## Conclusions.

L'application des statistiques à la médecine doit être utilisée avec beaucoup de prudence. Rappelons à ce propos « l'erreur moyenne » de L. Teleky qui, avec raison, demande un grand nombre d'expériences pour exclure les hasards. C'est pourquoi, en commentant les expériences relatées ci-dessus, nous n'avons pas donné de pourcentages, surtout parce que la tuberculose, la syphilis et la blennorrhagie sont des maladies très fréquentes. Il est donc fort possible qu'un même sujet soit atteint de plusieurs de ces infections. C'est dans ce sens qu'il faut interpréter les résultats obtenus.

Nous avons déjà dit que les résultats des différents auteurs ne peuvent pas être comparés entre eux, surtout parce que la technique qu'ils ont employée n'est pas la même. Récemment, Heymer et Schulte-Tigges, lors de leurs recherches, se crurent autorisés à rejeter le séro-diagnostic de la tuberculose, car ils constatèrent des réactions négatives dans de nombreux cas de tuberculose certaine et positive chez des sujets exempts de tuberculose. De même Reingardt n'attribue à la réaction sérologique de la tuberculose « aucune signification pour la pratique ». D'après nos investigations, ceci n'est certainement pas valable pour le séro-diagnostic comparé de certains

groupes de maladies. Nous insistons sur le fait qu'il faut utiliser toutes les méthodes de diagnostic pour éclaircir les cas douteux. Il est évident que dans ces cas, le séro-diagnostic ne doit pas être négligé. Souvenons-nous qu'au début, la valeur clinique du séro-diagnostic de la syphilis a souvent été mise en doute. Le perfectionnement des méthodes a permis d'obtenir des résultats qui confirment les prévisions optimistes. Le séro-diagnostic de la tuberculose et de la blennorragie peut rendre d'utiles services, surtout quand il s'agit d'un diagnostic différentiel. Néanmoins, la séro-réaction ne permet pas à elle seule d'établir définitivement un diagnostic. Les réactions sérologiques doivent être interprétées à la lumière des constatations cliniques. Dans les cas douteux, l'emploi simultané de plusieurs méthodes sérologiques peut être très utile.

## BIBLIOGRAPHIE

- BONGINELLI. *Il Dermosifilogr.*, 9, 1934, p. 567.  
BRANDT (R.). *Verhdl. 9. intern. Kongr. Dermat.*, 2, n° 8, 1936, p. 276  
FUENTE (Hita). *An. Asoc. españ. Progr.*, 401, n° 1, 1934.  
GERHARTZ. *Med. Klin.*, n° 9, 1935. ..  
HEYMER et SCHULTE-TIGGES. *Munch. med. Woch.*, n° 42, 1936.  
MEINICKE (E.). 17. *Kongr. der D. d. G.*, 8 octobre 1934.  
NÉKAM jr. (L.). *Ung. dermat. Ges.*, n° 1, 2 juin 1934.  
REINGARDT. *Munch. med. Woch.*, n° 44, 1936.  
SCHLESMAHN (Carl). *Zeit. f. Journ.*, n° 85, 1935, p. 254.  
TELEKY (L.). *Ges. d. Arzte in Wien*, 13 décembre 1936.



## SUR LA FLOCCULATION EN MILIEU TAMPONNÉ DE QUELQUES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES

par AUGUSTIN BOUTARIC et M<sup>me</sup> MADELEINE ROY.

La dilution d'un sérum dans l'eau distillée détermine des transformations assez complexes se traduisant par l'apparition d'un trouble, généralement attribué à la séparation des globulines qui, pour des dilutions convenables, se déposent au bout d'un temps plus ou moins long. Si l'on suit en fonction du temps les variations de la densité optique  $h$  relative à une radiation déterminée, on constate que cette densité optique augmente d'abord rapidement, puis de plus en plus lentement, et finit par atteindre une limite qui se maintient un certain temps, après quoi se produit la sédimentation des globulines.

L'influence qu'exerce le degré de dilution  $l$  (volume fourni par 1 cent. cube de sérum après sa dilution) sur la densité optique  $h$  est assez complexe : d'une part l'accroissement du degré de dilution modifie, d'une manière variable avec la nature des sérums, la précipitation des globulines ; d'autre part, il a pour effet d'augmenter le volume dans lequel se trouvent dispersées les particules qui ont pris naissance et, par suite, de réduire dans le même rapport le nombre de ces particules contenues dans l'unité de volume. On peut éliminer l'influence du second facteur en considérant, non la densité optique  $h$  elle-même, mais le produit  $lh$  du degré de dilution par la densité optique. Par un raisonnement simple s'appuyant sur la formule de Lord Rayleigh relative aux milieux troubles, il est facile d'établir que le produit  $lh$  peut être considéré à chaque instant comme sensiblement proportionnel au volume moyen  $v$  des particules de globuline qui ont pris naissance dans la solution (1). Même si la formule de

(1) A. BOUTARIC. *C. R. de l'Académie des Sciences*, **191**, 1930, p. 1332 ; *Bulletin de la Société chimique de France*, 4<sup>e</sup> série, **49**, 1931, p. 389.  
A. BOUTARIC et M. DOLADILHE. *C. R. de l'Académie des Sciences*, **194**, 1932, p. 1385.

Lord Rayleigh n'est pas suivie rigoureusement, on peut admettre que le produit  $lh$  varie dans le même sens que ce volume  $v$ .

Pour les mesures de densité optique relatives à la floculation des sérums, il y a intérêt à opérer sur des radiations de grande longueur d'onde, en tenant compte, bien entendu, de la sensibilité de l'œil, afin de se rapprocher le plus possible des conditions pour lesquelles la formule de Lord Rayleigh est applicable. Toutes nos déterminations ont été faites au moyen du spectrophotomètre de Jobin et Yvon, en lumière rouge, pour  $\lambda = 655 \text{ m}\mu$ .

Suivant les dilutions et l'opacité des mélanges, nous avons utilisé des cuves de 1, 5, 10 et 20 centimètres d'épaisseur ; de cette manière, même pour de très grandes dilutions et de faibles densités optiques, on peut, grâce à la grande épaisseur du liquide traversé, évaluer cette densité optique avec une précision suffisante. Le sérum à étudier étant versé dans un verre contenant la quantité d'eau nécessaire pour obtenir la dilution envisagée, on agite le mélange avec une baguette de verre et on l'introduit rapidement dans la cuve du spectrophotomètre.

Dans tous les cas, la densité optique croît en fonction du temps jusqu'à une valeur limite  $\pi$  qui se maintient pendant un temps plus ou moins long. Généralement, pour les dilutions très faibles ou très fortes, la densité optique limite est rapidement atteinte et elle se maintient ensuite pendant un temps relativement long (plusieurs heures) sans qu'on observe aucun changement apparent dans le mélange. Pour les dilutions moyennes, la densité optique limite est atteinte beaucoup plus rapidement, parfois en quarante-cinq minutes ou une heure, mais elle ne se maintient à cette valeur limite que pendant un temps assez court et on observe peu après la sédimentation des globulines. Dans tous les cas, la seule valeur de la densité optique qui puisse permettre de caractériser une dilution déterminée est la valeur limite  $\pi$  atteinte, au bout d'un temps plus ou moins long, suivant la valeur de la dilution ; c'est elle qui sera envisagée dans la suite de ce travail.

\*  
\* \*

Lorsqu'on utilise, pour diluer le sérum, de l'eau distillée ordinaire, la variation qu'éprouve la valeur limite du produit  $lh$  en fonction de la dilution  $l$  fournit des résultats assez incohérents, présentant parfois des maxima et des minima qu'on ne retrouve pas toujours lorsqu'on recommence l'expérience dans des conditions en apparence identiques. Nous avons été amenés à reconnaître que ces écarts devaient être rattachés en grande partie aux modifications que subit le  $pH$  de l'eau distillée, suivant les conditions de la distillation, le contact du verre, l'absorption du gaz carbonique de l'atmosphère, etc. Comme ces modifications du  $pH$  sont, sinon impossibles, du moins bien difficiles à éviter complètement dans les conditions ordinaires d'expérimentation, il nous a paru intéressant d'utiliser, pour effectuer la dilution, des solutions tamponnées ayant un  $pH$  convenable.

Nous nous sommes adressés aux solutions tamponnées de Sørensen, contenant des mélanges en proportions variables de phosphate monopotassique et de phosphate disodique dont le  $pH$  peut varier, suivant la composition de ces mélanges, de 5,3 à 8,04. Ces solutions sont trop concentrées pour provoquer la précipitation des globulines lorsqu'on les ajoute aux sérums, mais la précipitation se produit avec les solutions préalablement diluées au dixième ou au centième. Nous avons ainsi reconnu que la floculation est d'autant plus intense que les solutions utilisées pour provoquer cette floculation sont plus diluées et ont un  $pH$  plus faible.

Les nombres du tableau I indiquent la variation qu'éprouve le produit  $lh$  en fonction de  $l$  lorsqu'on utilise, pour la dilution, la solution tamponnée A de Sørensen renfermant 25 cent. cubes de  $PO^4Na^2H \frac{M}{15}$  et 975 cent. cubes de  $PO^4KH^2 \frac{M}{15}$  plus ou moins diluée.

TABLEAU I.  
VALEURS DE  $lh$  POUR LES DILUTIONS  $l$

| MILIEU DILUANT | $pH$ | 1    | 2    | 6    | 10   | 20   | 50    | 100   |
|----------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| A . . . .      | 5,29 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05  | 0,05  |
| 0,1 A . . .    | 5,30 | 0,05 | 0,20 | 1,68 | 3,03 | 5,18 | 7,55  | 7,55  |
| 0,01 A . .     | 5,30 | 0,05 | 0,20 | 1,68 | 3,03 | 5,00 | 10,60 | 14,40 |
| 0,001 A . .    | 5,42 | 0,05 | 0,20 | 1,67 | 3,04 | 5,00 | 11,85 | 15,60 |



Les résultats précédents montrent nettement que, pour une valeur du  $pH$  du milieu diluant très sensiblement constante, les valeurs du produit  $lh$ , pour les diverses dilutions de sérum, sont d'autant plus grandes que la solution tamponnée utilisée pour effectuer la dilution est moins riche en sels.

On obtient des résultats d'une très grande constance en adoptant, comme milieu diluant pour la floculation des sérums, la solution A de Sørensen préalablement diluée au 1/100. Dans ces conditions, en répétant l'expérience avec un même sérum, on obtient toujours, pour diverses dilutions  $l$ , la même valeur du produit limite  $lh$ , qui peut être regardée comme une constante permettant de caractériser le sérum du point de vue de son aptitude à floculer. Dans de nombreuses recherches sérologiques, on étudie la floculation des sérums par dilution dans divers milieux et les résultats obtenus sont parfois assez incertains. Nous pensons que, dans bien des cas, il pourrait y avoir intérêt à reprendre les mesures faites, en utilisant comme milieu diluant la solution tamponnée A de Sørensen préalablement diluée au 1/100 dans l'eau distillée. Avec un tel milieu, le produit  $lh$  augmente régulièrement à mesure que croît la dilution  $l$  pour tendre vers une valeur limite approximativement atteinte pour la dilution  $l = 100$  (1 cent. cube de sérum dans 99 cent. cubes de milieu diluant).

\*  
\* \*

Utilisant comme milieu diluant la solution tamponnée de Sørensen de  $pH$  5,3 préalablement diluée au 1/100, nous avons étudié la floculation qui se produit avec les divers sérums thérapeutiques que prépare l'Institut Pasteur.

Nous avons, en outre, procédé sur les mêmes sérums à la mesure précise de leur densité et à celle de leur viscosité, ces deux constantes étant mesurées à la température de 26°.

Le tableau II donne pour divers sérums thérapeutiques, mis très aimablement à notre disposition par M. Ramon, à qui nous exprimons ici toute notre reconnaissance : 1° la densité  $d$  à 26° ; 2° la viscosité relative  $\frac{\eta}{\eta_0}$  par rapport à l'eau distillée à 26° ; 3° la densité optique  $h$  pour  $\lambda = 655 \text{ m}\mu$  ; 4° le coeffi-

TABLEAU II. — Résultats relatifs à divers sérums thérapeutiques.

| NATURE DU SÉRUM<br>anti-  | $d$    | $\frac{\eta}{\eta_0}$ | $h$   | $\omega$ | $l$ H POUR $l$ |       |       |       |       |
|---------------------------|--------|-----------------------|-------|----------|----------------|-------|-------|-------|-------|
|                           |        |                       |       |          | 6              | 10    | 20    | 50    | 100   |
| Histolytique. . . . .     | 1,0234 | 1,720                 | 0,050 | 14,10    | 3,15           | 4,30  | 6,46  | 12,2  | 16,1  |
| Pneumocoque . . . . .     | 1,0219 | 1,736                 | 0,059 | 12,47    | 10,74          | 11,90 | 15,6  | 23,4  | 24,6  |
| Tétanos . . . . .         | 1,0245 | 1,820                 | 0,055 | 14,90    | 1,65           | 2,76  | 3,96  | 7,20  | 10,30 |
| Sporogène. . . . .        | 1,0250 | 1,822                 | 0,050 | 16,44    | 3,22           | 3,94  | 6,58  | 12,50 | 17,40 |
| Vibron septique . . . . . | 1,0255 | 1,834                 | 0,050 | 14,13    | 5,76           | 10,30 | 21,6  | 45,00 | 52,20 |
| Venimeux . . . . .        | 1,0260 | 1,894                 | 0,051 | 17,52    | 2,14           | 3,70  | 4,56  | 8,95  | 11,10 |
| Dysentérique . . . . .    | 1,0258 | 1,896                 | 0,050 | 17,92    | 2,92           | 4,16  | 5,34  | 9,15  | 14,90 |
| Streptocoque . . . . .    | 1,0250 | 1,906                 | 0,073 | 12,41    | 3,22           | 4,36  | 6,26  | 12,00 | 16,90 |
| Méningococcique . . . . . | 1,0241 | 1,957                 | 0,059 | 16,22    | 21,36          | 29,4  | 38,6  | 53,5  | 53,8  |
| OEdematiens. . . . .      | 1,0261 | 2,000                 | 0,055 | 18,18    | 4,17           | 6,26  | 10,28 | 17,4  | 20,9  |
| Perfringens . . . . .     | 1,0255 | 2,088                 | 0,073 | 14,90    | 1,50           | 6,26  | 16,8  | 38,00 | 53,8  |
| Diphthérique . . . . .    | 1,0305 | 2,397                 | 0,055 | 25,40    | 2,61           | 4,26  | 6,58  | 12,00 | 15,65 |

cient  $\omega = \frac{1}{h} \log_e \frac{\eta}{\eta_0}$  ; 5° les valeurs limites du produit  $lh$  fournies par la dilution du sérum dans la solution tamponnée pour  $l = 6, 10, 20, 50$ , et 100.

Les résultats contenus dans le tableau II ne font apparaître aucune relation simple entre la floculation qui se produit dans les divers sérums thérapeutiques au cours de leur dilution et les autres constantes physiques envisagées. Le pouvoir floculant, même lorsqu'on le détermine avec un milieu tamponné toujours identique à lui-même, apparaît donc comme une propriété assez complexe, en relation non seulement avec la richesse en protéine du sérum, mais encore, comme l'a montré récemment V. Chorine (2), avec la proportion d'euglobuline par rapport aux protéides totaux et, sans doute aussi, avec sa composition saline.

#### RÉSUMÉ.

Les auteurs ont appelé l'attention sur l'intérêt qu'il pourrait y avoir, lorsqu'on étudie la floculation des sérums, à adopter comme milieu diluant un milieu tamponné légèrement acide, par exemple la solution tamponnée de Sørensen ou mélange de phosphate disodique et monopotassique ayant un  $pH$  égal

(2) V. CHORINE. Ces Annales, 60, juin 1938, n° 6, p. 633.



à 5,3 et préalablement dilué au 1/100. En désignant par  $n$  la densité optique limite atteinte au cours de la floculation, le produit  $ln$  de la dilution par cette densité optique limite éprouve, dans tous les cas, une variation très régulière, augmentant progressivement avec la dilution jusqu'à atteindre une valeur limite pratiquement obtenue pour  $l = 100$  ; en aucun cas, on n'observe ces sortes de floculations périodiques signalées par quelques auteurs en étudiant la floculation avec l'eau distillée. On a déterminé les valeurs du produit  $ln$  relatif à un certain nombre de sérums thérapeutiques, ainsi que les densités et les viscosités de ces sérums.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*